

Die Isolierung der Farbstoffe des Fliegenpilzes (*Amanita muscaria*)

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Wolfgang Grob

aus Gelsenkirchen

Marburg 1966

Die Isolierung der Farbstoffe des Fliegenpilzes (*Amanita muscaria*)

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Wolfgang Grob

aus Gelsenkirchen

Marburg 1966



Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Philipps-Universität
Marburg/Lahn als Dissertation angenommen am: 16. Juni 1966

Tag der mündlichen Prüfung: 2. Juli 1966

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Musso

Mitberichterstatter: Prof. Dr. K. Dimroth

Meinen lieben Eltern
in Dankbarkeit

Diese Arbeit wurde im Chemischen Institut der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn Professor Dr. H. Musso in der Zeit von Juni 1964 bis Februar 1966 angefertigt.

Herrn Professor Dr. H. Musso danke ich besonders für die Stellung des Themas, wertvolle Ratschläge und die Unterstützung meiner Arbeit.

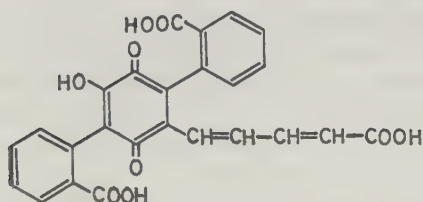
Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einführung	1
II. Ausgangsmaterial	2
III. Das Isolierungsproblem	4
1. Allgemeine Überlegungen	4
2. Verunreinigungen	4
3. Verhalten der Farbstoffe	6
a) Einfluß von Luft, Temperatur, Licht und P_H -Wert	6
b) Löslichkeit	7
c) Dialyse	7
d) Elektrophorese	8
e) Derivate	11
4. Wahl der Isolierungsmethode	11
a) Anionenaustauscher-Elektrophorese	11
b) Dialyse	12
c) Chromatographie allgemein	13
d) Sephadex	14
IV. Variationen der Adsorption der Farbstoffe an Sephadex	22
1. Chemische Variationsmöglichkeiten	22
2. Physikalische Variationsmöglichkeiten	22
a) Adsorption und Polarität des Lösungs- mittels	22
b) Adsorption und Ionenausschluß	25
c) Adsorption und Azidität	30
V. Isolierung der Farbstoffe	38
VI. Eigenschaften der Farbstoffe	43
VII. Diskussion der Ergebnisse	51
VIII. Zusammenfassung der Ergebnisse	53
IX. Experimenteller Teil	54
X. Literaturverzeichnis	65

Digitized by the Internet Archive
in 2026

I. Einführung

Im Jahre 1930 veröffentlichten F. Kögl und H. Erxleben¹⁾ im Rahmen ihrer Untersuchungen über Pilzstoffe eine Formel für den roten Farbstoff des Fliegenpilzes (*Amanita muscaria*), den sie Muscarufin nannten. Die damals für diese Struktur angeführten Argumente erscheinen im Lichte der heutigen Forschungsmethoden keineswegs als eindeutig und beweisend.



Muscarufin

An der Richtigkeit dieser Formel sind neuerdings in mehreren Laboratorien Bedenken erhoben worden, so daß eine Nachprüfung interessant geworden ist. Es gelang einigen Arbeitsgruppen nicht, die von Kögl angegebene Isolierung zu reproduzieren. Bedenklich erscheint die Angabe von Kögl, daß es ihm gelang, den Rohfarbstoff mit konzentrierter Silbernitratlösung als Silbersalz zu fällen und daraus den Farbstoff mit alkoholischer Salzsäure zu regenerieren. Die einzige Angabe von Kögl, die bestätigt werden konnte, war die äußerst geringe Beständigkeit des Farbstoffs im Pilzextrakt²⁾. Es erschien deshalb angebracht, die Isolierung des Muscarufins erneut zu versuchen, wobei von vorneherein die Methode von Kögl unberücksichtigt gelassen und ein anderer Weg beschritten werden sollte. Die ersten Versuche zeigten, daß der Farbstoff nicht einheitlich ist, sondern aus einem Gemisch verschiedenfarbiger Komponenten besteht³⁾.

II. Ausgangsmaterial

Als die Arbeit über Muscarufin im Januar 1963 begonnen wurde, standen Rohextrakte aus den Jahren 1961 und 1962 zur Verfügung. Sie waren gewonnen worden, indem man den jeweils im September in der Nähe von Marburg und im Bayrischen Wald gesammelten Pilzen die rote Haut des Hutes abzog und sie kalt mit Methanol extrahierte. Die reichlich verdünnten Lösungen waren im Wasserstrahlvakuum bei Raumtemperatur zu Dicksäften konzentriert worden.

An dieser Gewinnungsweise des Rohstoffes ändert sich in den kommenden Jahren insofern etwas, als sich im Verlauf der Untersuchungen die Methanolextraktion als ungenügend für die Farbstoffe mit längerwelligem Absorptionsmaximum herausstellt. Es werden daher zunächst wäßriges Methanol und schließlich reines Wasser als Extraktionsmittel verwendet^{X)}. Gesammelt werden die Pilze jeweils im September in der Nähe von Marburg. Für die Untersuchungen werden die Rückstände der gefriergetrockneten Dicksäfte verwandt. Als Indikator für die Farbstoffe dient allein ihr Elektronenspektrum mit dem gut ausgeprägten Maximum bei 480 m μ und einer niedrigen Schulter um 540 m μ .

X) Daß die von Kögl angegebene Extraktion mit Äthanol zum (sicherlich nicht vollständigen) Erfolg führte, dürfte allein dem Umstand zu danken sein, daß die Pilzhäute viel Wasser (ca. 85 %) enthalten. Unter den Kögl'schen Bedingungen dürfte das letztlich wirksame Extraktionsmittel 50 %iges Äthanol gewesen sein, Äthanol allein ist ungeeignet.

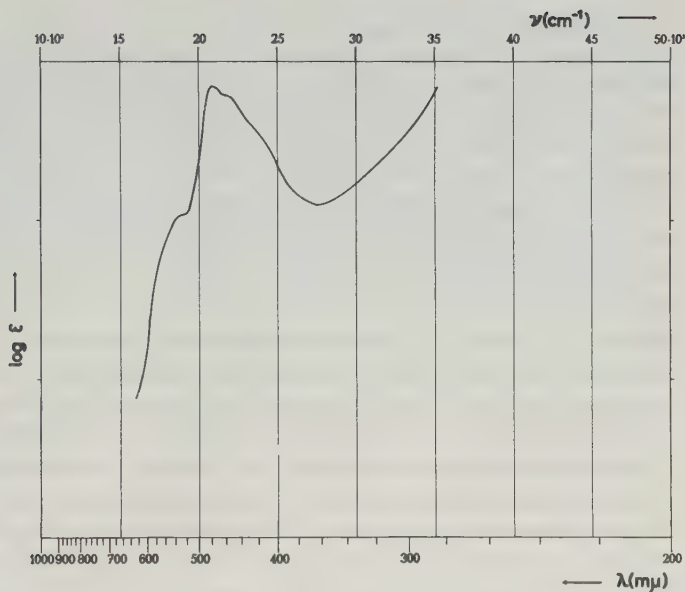


Abb. 1 UV-Spektrum des Rohextraktes 1964 in Wasser

Die schwache Schulter bei 425 $m\mu$ enthält einen, vielleicht auch mehrere gelbe Farbstoffe, die nicht näher untersucht werden.

III. Das Isolierungsproblem

1. Allgemeine Überlegungen

Für die Isolierung entscheidend sind die Eigenschaften der Farbstoffe. Geht man davon aus, daß die Kögl'sche Formel falsch ist, so begibt man sich des einzigen Hinweises auf die chemische Natur der Farbstoffe und hat es dann mit völlig unbekannten Substanzen zu tun. Aber auch dann, wenn sie richtig ist, kann sie nur für einen Farbstoff aus dem Gemisch zutreffen; für welchen, darüber fehlt jeder Hinweis.

Das einzige Charakteristikum der Farbstoffe, das man für die Praxis besitzt, ist das Elektronenspektrum des Rohextraktes in wäßriger Lösung und hier-von auch nur der Teil im sichtbaren Bereich, der übrige wird von Verunreinigungen überlagert. Das bedeutet, daß man eine Veränderung der Farbstoffe nur dann erkennen kann, wenn der Chromophor mitbetroffen ist, alle anderen Reaktionen der Molekel entziehen sich einer Kontrolle. Ferner befinden sich die Farbstoffe im Rohextrakt zusammen mit einem großen Überschuß weitgehend unbekannter Verunreinigungen. Dies bringt eine weitere Schwierigkeit mit sich bei der Beurteilung, ob eine chemische Reaktion direkt mit den Farbstoffen oder indirekt über eine Verunreinigung oder deren Reaktionsprodukt erfolgt ist. Diese Umstände beschränken jede Kontrollmöglichkeit und lassen von vorneherein jede Isolierung der Farbstoffe über ein Derivat fragwürdig erscheinen. Ganz allgemein verlangen sie große Vorsicht beim präparativen Vorgehen und bei der Beurteilung, ob das gezeigte Verhalten der Farbstoffe in der Rohlösung deren wirklichen Eigenschaften entspricht oder unter dem Einfluß der Verunreinigungen nur vorgetäuscht wird.

2. Verunreinigungen

Der Rückstand aus den Rohextrakten enthält etwa 1 % Farbstoffe. Für die Isolierung ist es wichtig zu wissen, welche Verbindungen beim Extrahieren der Farbstoffe aus

der Haut des Pilzhutes mit herausgelöst werden.

Aus der Literatur ist bekannt, daß im Fliegenpilz enthalten sind: Muscarin⁴⁾, Cholin⁵⁾ (Amanitin), Ölsäure, Palmitinsäure, Buttersäureglycerid, Ergosterin⁶⁾, Propionsäure, Fumarsäure, Glucose, Mannit, Trimethylamin, Leucin, Eiweiß⁷⁾, Chitin⁸⁾, Hercynin, Putrescin⁹⁾, Xanthin, Hypoxanthin¹⁰⁾, Bufotenin¹¹⁾, Adenosin(V)¹²⁾, Acetylcholin, Muscaridin¹³⁾, Ibotensäure, Muscazon¹⁴⁾; ferner Kalium, Natrium, Magnesium, Calcium, Aluminium, Eisen, Mangan, Phosphat, Chlorid, Sulfat⁶⁾, Vanadin¹⁵⁾. Da mit einem polaren Lösungsmittel extrahiert wird, kommen als mögliche Begleitstoffe vor allem Zucker, Eiweiß und Aminosäuren in Frage. Der Nachweis erfolgt in allen Fällen papierchromatographisch auf Ringchromatogrammen. An freien Aminosäuren lassen sich so etwa ein Dutzend nicht näher bestimmter Vertreter nachweisen (Abb. 2). Die kleineren Zucker bestehen im wesentlichen aus Glucose (Abb. 3). (Abb. 2 und 3 siehe nächste Seite.)

Die Abwesenheit von Eiweiß wird dadurch wahrscheinlich gemacht, daß eine bei 110°C 24h lang in 6n Salzsäure hydrolysierte Probe dasselbe Aminosäurechromatogramm gibt, wie eine nicht behandelte. Eine weitere Substanz, die in großen Mengen isoliert wird, ist Mannit, der durch sein IR-Spektrum, Schmelzpunkt ($F = 164 - 165^{\circ}\text{C}$) und Mischschmelzpunkt identifiziert wird.

Die anorganischen Verunreinigungen machen ungefähr 20 % von einem gefriergetrockneten Rückstand aus. Ihre Zusammensetzung ist qualitativ folgende:

Hauptbestandteile: $\underline{\text{K}}$, $\underline{\text{PO}_4}$, Cl

Nebenbestandteile: SO_4 , CO_3 (C)

Spuren : Al, Fe, Na, Mg, V, Zn, Cu

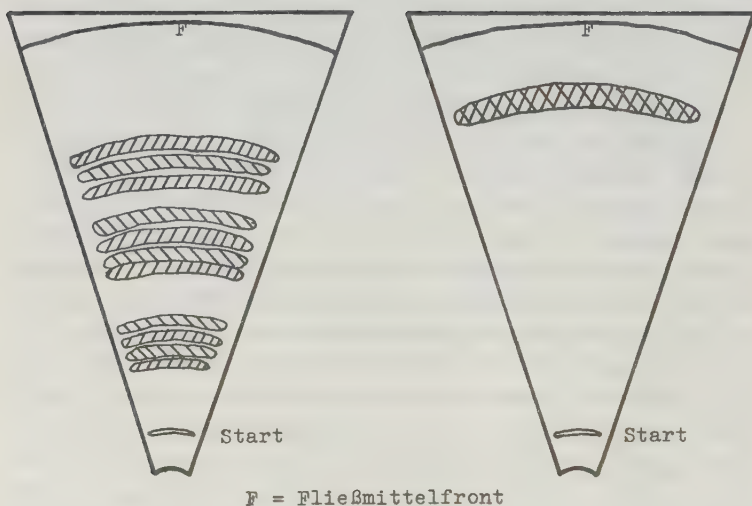


Abb. 2 Papierchromatogramm
der Aminosäuren

Abb. 3 Papierchromatogramm
der Zucker (Glucose)

Fließmittel: Collidin : Lutidin : Wasser = 1:1:1

3. Verhalten der Farbstoffe

a) Einfluß von Luft, Temperatur, Licht und P_H -Wert der Lösung

Da der Farbstoff als sehr empfindlich gilt, werden zunächst der Einfluß von Luft, Temperatur, Licht und P_H untersucht. Luft zeigt keinen, Temperatur von der Größenordnung der Zimmertemperatur nur einen geringen schädigenden Einfluß. Anders wirkt Licht; an diffusem Tageslicht beträgt der tägliche Extinktionsverlust ca 4 %. In 2n

Lauge verblassen die Farbstoffe in wenigen Minuten, in 2n Säure in einigen Stunden, Bei den P_H -Untersuchungen ergibt sich kein klares Bild. Die Messungen umfassen den P_H -Bereich von 1 - 10. Hierbei kann kein deutliches Stabilitätsmaximum festgestellt werden. Es ergibt sich lediglich eine etwas größere Beständigkeit um P_H 4 und 5. Auch führen verschiedene Puffer bei gleichem P_H -Wert nicht zum selben Ergebnis. Vielfach zeigen die gepufferten Proben (P_H 6 und 7) einen stärkeren Zerfall als die ungepufferten von gleichem P_H -Wert. Dies läßt auf einen nachteiligen Einfluß der Pufferelektrolyte Phosphat und besonders Borat schließen. Da die Farbstoffe auch in neutralen Kaliumsulfat-Lösungen bei steigender Kaliumsulfat-Konzentration stärker zerfallen, muß man eine allgemeine Elektrolytempfindlichkeit der Farbstoffe annehmen.

b) Löslichkeit der Farbstoffe

Die Löslichkeitsversuche zeigen, daß Löslichkeit und Beständigkeit der Farbstoffe der Wahl des Lösungsmittels sehr enge Grenzen setzen. In allen gebräuchlichen organischen Lösungsmitteln wie Benzol, Äther, Chloroform, Äthanol ... sind sie unlöslich. Wie ein Mischungsversuch von Wasser und Methanol demonstriert, führen lediglich Lösungsmittel von einer Dielektrizitätskonstanten (DK) von mindestens 50 (Methanol:Wasser = 60:40) zu Lösungen brauchbarer Konzentration. Unterschreitet man diesen Wert, so tritt keine genügende Lösung ein, oder aber die Begleitstoffe beginnen auszufallen, wobei sie die Farbstoffe weitgehend mitreißen. Hinzu kommt noch, daß die Beständigkeit in Lösungen mit einer $DK < 30$ stark abnimmt. Dies geht aus einem Mischungsversuch Aceton-Wasser hervor. In Lösungsmitteln mit OH-Gruppen scheint die Stabilität größer zu sein.

c) Dialyse

Dialysiert man eine wäßrige Farbstofflösung gegen Wasser in einem "Cellophan"-Dialysierschlauch, so beginnt

sich die äußere Flüssigkeit langsam zu färben. Das UV-Spektrum der äußeren Lösung gleicht dem Originalspektrum, es sind also alle Farbstoffe durchgewandert. Die Mindestgröße der Schlauchporen beträgt 25 Å. Mit folgender Gleichung

$$M = 8r^3 \cdot d \cdot N \quad (1)$$

M = Molgewicht

d = Dichte

$$N = 6,023 \cdot 10^{23}$$

r = Radius des kugelförmig
gedachten Moleküls

läßt sich roh das Molekulargewicht abschätzen, bis zu dem die Moleküle noch passieren können. Die Gleichung läßt sich ableiten aus folgenden Beziehungen

$$I \quad V = \frac{M}{d} \quad II \quad e = 2r \quad III \quad V = e^3 \cdot N$$

V = Molvolumen

e = Kante des Würfels, der das Molekül
umschließt.

Setzt man 25 Å in Gleichung (1) ein, so erhält man für d = 1 ein Molgewicht von 9400, bis zu dem die Moleküle noch dialysieren können.

d) Elektrophorese

Im elektrischen Feld wandern die Farbstoffe als Anionen. Führt man die Wanderungsversuche auf einem Papierstreifen bei verschiedenen P_H -Werten durch, so läßt sich eine anionische Fortbewegung bis zu P_H 2 verfolgen. Hierbei tritt jedoch eine starke Zonenverlängerung ein, was zeigt, daß nicht mehr alle Farbstoffe bis zu diesem P_H -Wert wandern. Eine Umkehr der Wanderungsrichtung findet bei keinem P_H -Wert statt.

Einen genaueren Aufschluß über die Verhältnisse der Wanderungsgeschwindigkeiten der einzelnen Farbstoffe gibt eine trägerlose Elektrophorese im "Elphor VaP" der Firma "Bender und Hohbein" bei P_H 3 und 4,5. Die Wirkungsweise des Gerätes ist folgende: Senkrecht zur Ström-

mungsrichtung der Lösungsfront wird ein elektrisches Feld angelegt, das die Elektrolyte senkrecht zur Strömungsrichtung eine Zusatzbewegung mit der Geschwindigkeit v machen läßt. Vektoraddition der Geschwindigkeiten in den beiden Richtungen führt zu einer resultierenden Gesamtgeschwindigkeit (v_g), die mit der Strömungsgeschwindigkeit (u) einen bestimmten Winkel, den Ablenkungswinkel α , bildet. Abb. 4 veranschaulicht den Vorgang.

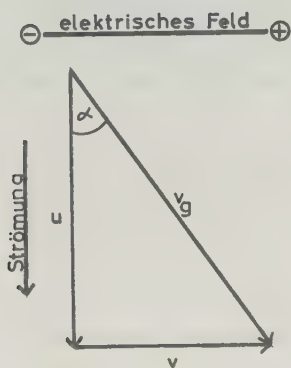


Abb. 4

Da α proportional v ist und v gegeben durch die Beziehung

$$v = \frac{Q \cdot H}{6 \pi \cdot \eta}$$

Q = Ladung des Ions, H = Feldstärke,

η = Viskosität der Lösung

ist die Ablenkung ein Maß für die Ladung des Ions, bzw., da es sich bei den Farbstoffen um Protolyte handelt, ein Maß für ihren Dissoziationsgrad.

Aus der unterschiedlichen Ablenkung lassen sich bei

P_H 3 deutlich 5 Komponenten und bei P_H 4,5 bei kleinen α -Werten eine sechste feststellen. Ihre Reihenfolge in der Ablenkung ist gelb > längerwellig (B_1) > kürzerwellig (A_1) > längerwellig (B_2) > kürzerwellig (A_2) > kürzerwellig (A_3). Die Trennung ist allerdings nicht so gut, daß für alle Farbstoffe die Maxima sauber herauskommen. Lediglich die Maxima für die zwei orangefarbenen Hauptfarbstoffe A_1 und A_2 sind sicher zu bestimmen. Sie liegen beide bei 478 $m\mu$ mit einer hohen Schulter bei 458 $m\mu$. Die Maxima der Farbstoffe B_1 und B_2 bilden jeweils eine niedrige Schulter wie im Originalspektrum (Abb. 1). Das Maximum von B_1 dürfte bei 540 $m\mu$, das von B_2 < 540 $m\mu$ liegen. Das Maximum des gelben Farbstoffes befindet sich bei ca. 425 $m\mu$; es bildet die schwache kurzwellige Schulter (Abb. 1).

Die Konzentrationsverhältnisse bei den orangefarbenen Farbstoffe betragen auf Grund ihrer Gesamtextinktion (Extinktion der Fraktion x Anzahl der Fraktionen) grob geschätzt:

$$A_1 \gg A_2 \gg A_3$$

für die längerwellig absorbierenden

$$B_1 > B_2.$$

Da der gelbe Farbstoff nur schwach vertreten ist, hat man es darum im wesentlichen mit 4 Komponenten zu tun:

$$A_1, A_2, B_1 \text{ und } B_2.$$

Aus ihrer Absorption kann man sich das Originalspektrum zusammen setzen. Die weiteren Untersuchungen gehen daher von diesen 4 Farbstoffen aus. Erst im letzten Teil der Arbeit, nachdem die Ernte von 1965 mit Wasser extrahiert wurde, tritt hierzu noch ein dritter längerwellig absorbierender Farbstoff.

Entsprechend dem anionischen Verhalten bei der Elektrophorese werden alle Farbstoffe auf einem Anionenaustauscher (DEAE-Sephadex A-25) adsorbiert.

e) Derivate

Obwohl die Überführung der Farbstoffe in ein Derivat nicht sehr erfolgversprechend erscheint, muß diese Möglichkeit doch probiert werden. Da die Farbstoffe sehr gut wasserlöslich sind, verdanken sie diese Eigenschaft vielleicht einem hohen Gehalt an Hydroxylgruppen, die man durch Acetylieren hydrophob machen kann. Aus einer Lösung von 25 ml Formamid, 1 ml Pyridin und 200 mg gefriergetrocknetem Rohextrakt, der man langsam bei -10° 10 ml Acetanhydrid zutropfen läßt, können jedoch keine farbstoffähnlichen Produkte isoliert werden.

Die anionische Natur der Farbstoffe läßt das Vorliegen einer OH-aziden Verbindung vermuten, die man mit Diazomethan verestern oder veräthern können sollte. Da bei der Methylierung auch Aminosäuren verestert werden, steigt der P_H -Wert der Lösung stark an. Daher wird durch Zugabe von Schwefelsäure und P_H -Kontrolle mit einem P_H -Meter der P_H -Wert zwischen 5 und 6 gehalten. Ein Methylierungsversuch in wässriger Lösung eines Rohextraktes bei $0^{\circ}C$ mit überschichteter ätherischer Diazomethanlösung bringt jedoch kein Erfolg. Die Farbstoffe in der wäßrigen Lösung werden dabei zerstört.

4. Wahl der Isolierungsmethode

a) Anionenaustauscher-Elektrophorese³⁾

Auf Grund des anionischen Charakters der Farbstoffe sollte eine Trennung und Reinigung an einem Ionenaustauscher bzw. mit Hilfe der Säulenelektrophorese grundsätzlich möglich sein. Beide Methoden scheitern aber daran, daß

1. der Trenneffekt zu gering ist,
2. die Elutions- bzw. Leitungselektrolyte nicht wieder abgetrennt werden können. Selbst Ammoniumformiat läßt sich in der Gefriertrocknung nicht vollständig absublimieren,
3. mindestens 25 % der Verunreinigungen selbst

Anionen sind; denn vom Anionenaustauscher lassen sich nur 75 % der Verunreinigungen mit Wasser eluieren.

b) Dialyse

Bei der einfachen Dialyse in Wasser mit einem "Cellophan"-Dialysierschlauch treten, wie bereits erwähnt, langsam erhebliche Mengen Farbstoffe durch die Membrane. Das Verfahren wird darum abgeändert. Das Ziel dabei ist, einmal den Trenneffekt der Dialyse zu verstärken und die Schwerlöslichkeit der Farbstoffe in unpolaren Lösungsmitteln auszunutzen. Zu diesem Zweck wird nicht in Wasser dialysiert, sondern zunächst in reinem Methanol, dem dann stufenweise Wasser zugesetzt wird. Die äußere Dialysierflüssigkeit wird für jede Stufe erneuert. In reinem Methanol quillt die Membrane praktisch nicht, die Farbstoffe können also schon wegen ihrer Größe kaum austreten, hinzu kommt, daß das anfängliche Lösungsmittel Wasser im Dialysierschlauch schnell dialysiert und Methanol eindiffundiert. Dadurch werden die Farbstoffe weitgehend gefällt oder an ausgefallenen Verunreinigungen adsorbiert. Erst mit steigendem Wassergehalt beginnt dann eine merkliche Dialyse der Farbstoffe. Gelöst werden 350 mg fester Rohextrakt in 1 ml Wasser, das äußere Volumen beträgt 200 ml. Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse.

Methanol- gehalt in %	100	90	70	60	Wasser	Rück- stand
Zeit [h]	17,5	31	25,3	24	24	-
Gewicht im Dia- lysat [mg]	450 (ölig)	80	101	5,8	4,7	5,2

Tabelle 1

Das äußere Volumen ist darum so groß gewählt, damit

auch kleine aber in Methanol schwerlösliche Stoffe in Lösung gehen und dialysieren. Da sich die Farbstoffe in den Eluaten mit 90, 70, 60 proz. Methanol und Wasser befinden, ergibt sich eine Abtrennung von 45 % der Verunreinigungen in der 1. Fraktion. Auch nach der Dialyse in reinem Wasser enthielt der Schlauch noch Farbstoffe, allerdings in sehr geringen Mengen.

c) Chromatographie allgemein

Da es sich bei den Farbstoffen um empfindliche Substanzen handelt, müssen bei der Suche nach einem Reinigungsverfahren zwei Forderungen berücksichtigt werden: die Methode muß schnell und schonend sein. Vor allem schonend, da nicht alle eventuellen Veränderungen an der Farbstoffmolekel kontrolliert werden können. Chromatographische Verfahren erfüllen im allgemeinen diese Voraussetzungen, und da die Farbstoffe sich aus wäßriger Lösung nicht mit organischen Lösungsmitteln ausschüttern lassen, wird versucht, sie chromatographisch anzureichern. Hier lassen aber die Löslichkeit der Farbstoffe und ihre Beständigkeit nur einen engen Spielraum zu. Als Lösungsmittel kommen eigentlich nur Wasser und Wasser/Methanol-Gemische bis zu 60 % Methanolgehalt in Frage. Formamid und Formamidgemische sind zwar gute Lösungsmittel, scheiden aber aus, da Formamid nicht wieder von den Farbstoffen abgetrennt werden kann. Verteilungschromatographische Verfahren scheitern daher entweder an der Unbeständigkeit der Farbstoffe in der unpolaren Phase oder aber an der zu geringen Löslichkeit; bei höherer Konzentration tritt Phasentrennung ein und auf Zusatz von Löslichkeitsvermittlern, wie z.B. Methanol, zeigt sich keine Trennung. Damit scheiden alle verteilungschromatographischen Verfahren aus.

Auf Grund der engen Lösungsmittelwahl verspricht auch Adsorptionschromatographie wenig Erfolg. Versuche an saurem und basischem Aluminiumoxid, Silicagel, Stärke, Cellulose und Polyamid mit reinem Wasser und Methanolgemischen als mobiler Phase verlaufen erfolglos. Mit

Wasser bleiben auf saurem Aluminiumoxid fast alle Farbstoffe irreversibel hängen, auf basischem Aluminiumoxid einige, bei Polyamid tritt teilweise Adsorption ein, die nur mit starker Elektrolytlösung wieder aufgehoben werden kann. Bei allen übrigen laufen die Farbstoffe durch, ohne daß eine Reinigung oder Trennung eingetreten ist. Mit Methanol-zusätzen bis zu 60 % (für Aluminiumoxid und Polyamid nicht durchgeführt) zeigt sich überall eine geringe Fraktionierung, am deutlichsten bei Stärke, aber eine Reinigung tritt auch hierbei nicht ein.

d) Sephadex

Alle genannten chromatographischen Verfahren scheitern, da das einzige brauchbare Lösungsmittel für die Farbstoffextrakte Wasser ist. Das ideale Reinigungsverfahren erscheint darum die am Ende der 50er Jahre aufkommende Methode der Gelfiltration¹⁶⁾. Hier ist es vor allem ein Gel, das von der Firma "Pharmacia", Uppsala, unter dem Handelsnamen "Sephadex" vertrieben wird. Es wird durch Quervernetzung hochmolekularer Dextrane (Molgewicht 30 - 50000) gewonnen. Über Herstellung und Eigenschaften unterrichtet Literaturzitat¹⁷⁾, einen weiteren Überblick über Chromatographie an porösen Gelen gibt Literaturzitat¹⁸⁾.

Sephadex benötigt Wasser als Quellmittel und gestattet das Arbeiten in reinem Wasser. Seine Wirkungsweise beruht auf dem sogenannten Molekülsiebeffekt. Er kommt dadurch zustande, daß die Diffusion in die wassergefüllten Poren einer gequollenen Gelpartikel für ein Molekül von dessen Größe abhängt. Bezeichnet man das gesamte Porenvolumen einer Gelmenge mit V_i und das davon für eine Molekel zugängliche mit V_p , so ist das Verhältnis von $\frac{V_p}{V_i}$ ein Maß für ihre Eindringtiefe. Es stellt einen für die betreffende Molekel charakteristischen Wert dar und soll mit K_d bezeichnet werden. Im allgemeinen sind die Poren nicht gleichförmig, so daß man nur von einer durchschnittlichen Eindringtiefe reden kann. Geht man

aber idealisierend von kegelförmigen Poren^{x)} aus, so läßt sich die Abhängigkeit von Eindringtiefe und Molekülgröße folgendermaßen veranschaulichen (Abb. 5):

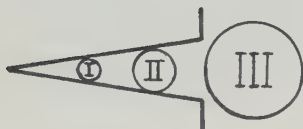


Abb. 5

Molekel I und II dringen ein $K_{dI,II} > 0 < 1$; $K_{dI} > K_{dII}$. Molekel III kann nicht eindiffundieren: $K_{dIII} = 0$. Der andere Extremfall: $K_d = 1$ läßt sich an diesem Modell nicht darstellen, ist aber in der Praxis gegeben.

Chromatographisch läßt sich diese Unterscheidung nach der Molekülgröße zu einer Trennung verschieden großer Moleküle verwenden. Man kann das Gelinnere als eine Phase und das äußere Volumen als die andere bezeichnen. Die Trennung zweier Stoffe beruht dann wie bei allen chromatographischen Verfahren auf ihrer unterschiedlichen Verteilung in diesen beiden Phasen. Unter der Bedingung, daß ein Diffusionsgleichgewicht des Stoffes zwischen beiden Phasen besteht, setzt sich dessen Diffusionsraum längs einer Säule zusammen aus dem äußeren Volumen V_o , das gleich dem Volumen zwischen den Gelkörpern ist, und dem in den Gelkörpern zugänglichen Volumen $V_p = K_d \cdot V_i$. Die Summe dieser beiden Volumina ist nötig, um den Stoff durch Elution wieder von der Säule zu verdrängen. Das Elutionsvolumen V_e ist daher:

$$V_e = V_o + V_p = V_o + K_d \cdot V_i \quad (1)$$

x) J. Porath¹⁹⁾ geht von kegelförmigen Poren aus und gelangt mit Hilfe der Proportionalität von Molekulargewicht (MG) und Quadrat des Molekelradius, die sich aus der statistischen Behandlung flexibler Makromoleküle mit dem effektiven Radius und gleichen Segmenten²⁰⁾ ergibt, zu einer Beziehung von $\sqrt[3]{K_d} \approx \sqrt{MG}$. Diese Beziehung ist bei einigen Polysacchariden¹⁹⁾ und Proteinen²¹⁾ gut erfüllt.

Diese Beziehung gilt aber nur unter der weiteren Bedingung, daß keine Wechselwirkung des Stoffes mit der Gelmatrix eintritt, wie z. B. Adsorption. Eine unterschiedliche Verteilung zweier Stoffe zwischen beiden Phasen hat ein unterschiedliches Elutionsvolumen zur Folge, und zwar ist es für eine größere Molekel kleiner, sie tritt also zuerst aus der Säule aus. Diese Volumendifferenz stellt das Separationsvolumen V_s dar. Da für zwei Stoffe V_o gleich ist, ist es gleich der Differenz der V_p -Volumina:

$$V_{sI/II} = V_{pI} - V_{pII} = V_i \cdot (K_{dI} - K_{dII}) \quad (2)$$

Es gibt die Trennleistung einer Säule an und stellt das obere Maß für das Lösungsvolumen der Proben dar, bis zu dem gerade noch eine Trennung zweier Stoffe eintritt.

Bei einem gegebenen Gel ist die Größe der Poren abhängig vom Vernetzungsgrad, und zwar ist sie umso größer, je geringer das Gel vernetzt ist. Der Fraktionierungsbereich bestimmter Molekülgrößen ist daher abhängig vom Vernetzungsgrad. Bei Sephadex ist der Fraktionierungsbereich durch eine Zahl gekennzeichnet: z. B. G 25.

Von den Sephadextypen werden ausprobiert: Sephadex G 25, G 50, G 75, jeweils die kleinste Korngröße. Die Sephadexdaten enthält Tabelle 2.

Geltyp	Gesamt- volumen V_t [ml]	äußeres Volumen V_o [ml]	inneres Volumen V_i [ml]	Ausschlußgrenze
Sephadex G 25	5	2	2,5	5000
Sephadex G 50	10	4	5	10000
Sephadex G 75	13	5	7	50000
Sephadex G 100	17	6	10	100000
Sephadex G 200	30	9	20	200000

Tabelle 2

Die nachstehenden Diagramme (Abb. 7 - 9) geben die Ergebnisse wieder. Die Fraktionen sind nicht volumenkonstant, sondern nach unterscheidbaren Zonen (siehe Abb. 6) aufgefangen. Abb. 6 - 9 stehen auf Seite 18.

In den Diagrammen gibt die Gerade die spezifische Extinktion des Rohextraktes bei 480 m μ (ϵ_{480}^s) an, die durchgezogene Kurve (—) die spezifische Extinktion bei 480 m μ für die einzelnen Fraktionen, die gestrichelte (---) den prozentualen Verbleib der Gesamtfarbstoffmenge ϵ_{480}^s (Rohextrakt)·Gewicht des Ansatzes in den einzelnen Fraktionen und die strichpunktiierte (-.-.-) den prozentualen Verbleib des Ansatzes in den Fraktionen. VL ist der Vorlauf, NL der Nachlauf. Für die Farbstoffe B₁ und B₂ liegen die Verhältnisse ähnlich.

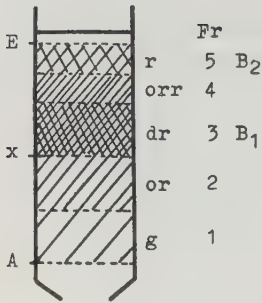
Aus der Parallelität von Farbstoff- und Einsatzkurve ergibt sich, daß keine wesentliche Reinigung der Farbstoffe stattgefunden hat. Auch die Trennung der Farbstoffe ist ungenügend, wie das Chromatogramm (Abb. 6) zeigt; es ist für alle drei Säulen das gleiche. Nimmt man die Kurve für 480 noch hinzu, so kann man sagen, daß eine Reinigung nur für einen Teil der Farbstoffe am oberen Ende der Säule zu Lasten des großen stattgefunden hat, d. h. die Menge an abgetrennten Verunreinigungen - auf die es ankommt - ist gering und damit die Methode schlecht.

Dies Ergebnis ist zunächst nicht erwartet worden, und da kaum noch ein Spielraum an Isolierungsmethoden besteht, wird die Ursache für das Versagen der Sephadexmethode näher untersucht.

Die Ursache ist sicherlich eine Störung, denn bei der Sephadex G 25-Säule liegt Glucose in der 2. und 3. Fraktion, die Aminosäuren befinden sich in der Hauptsache in der 3. und 4. Fraktion. Das würde bedeuten, daß die Farbstoffe in der Größenordnung einer Aminosäure oder Glucose liegen, was ziemlich unwahrscheinlich ist.

Mit Hilfe von Gleichung (1):

$$V_e = V_0 + K_d \cdot V_i$$



dr=dunkelrot;g=gelb
or=orange;r=rot
orr=orangerot
Fr=Fraktion

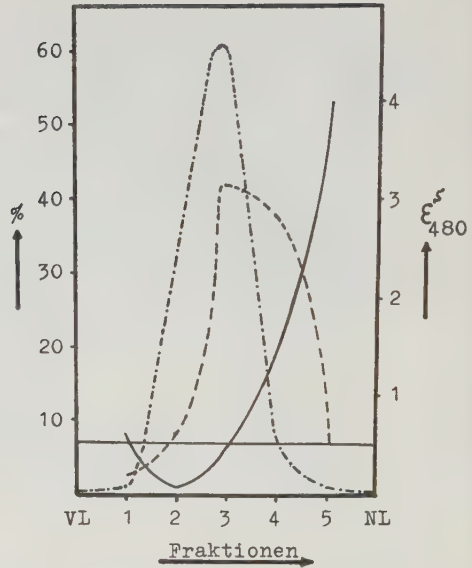


Abb. 6

Chromatogramm auf
Sephadex G 25

Abb. 7 Chromatographie an Sephadex G 25
mit Wasser

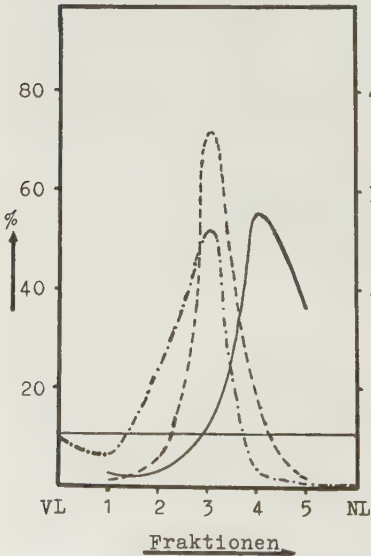


Abb. 8 Chromatographie an Se-
phadex G 50 mit Wasser

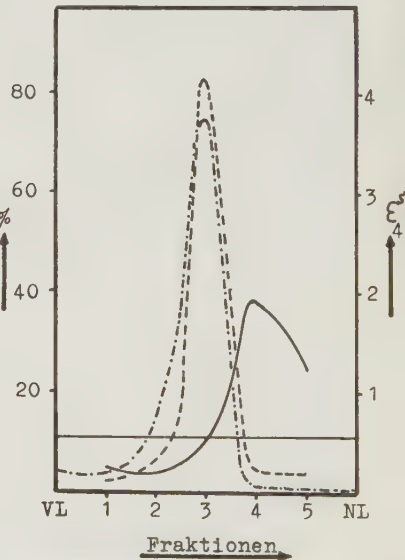


Abb. 9 Chromatographie an Se-
phadex G 75 mit Wasser

lassen sich die Grenzwerte der Elutionsvolumina für $K_d = 1$ und $K_d = 0$ bei den einzelnen Säulen berechnen: der obere ist $V_o + V_i$ und der untere V_o . Die Zahlenwerte sind in Tabelle 3 angegeben; die zu ihrer Berechnung nötigen Sephadexwerte enthält Tabelle 2.

Säulen- typ L: 25 cm; Ø 9 cm	V_t [ml]	V_o [ml]	V_i [ml]	$V_o + V_i$ [ml]	V_e	
					A	E
Sephadex G 25	16	6,4	8	14,4	7,6	9,8
Sephadex G 50	16	6,4	8	14,4	14	22,6
Sephadex G 75	16	6,2	8,6	14,8	13,4	23

Tabelle 3

Die in der Rubrik V_e unter A angegebenen Werte stellen das Elutionsvolumen bis zum Anfang der Farbstoffzone, die alle Farbstoffe zusammen bilden, und unter E bis zu deren Ende dar. Die Werte sind nicht gemessen, sondern berechnet aus der Tropfgeschwindigkeit, dem Tropfenvolumen und der Laufzeit und besitzen einen Fehler von $\pm 10 \%$. Bei den Sephadexwerten in Tabelle 2 beträgt die Fehlergrenze $\pm 10 \%$ ("Pharmacia"). Mit diesem Fehler sind also auch noch die Säulendaten in Tabelle 3 belegt. Trotz dieser erheblichen Fehlergrenzen kann man - zumindest für den zweiten Teil der Farbstoffzone - sagen, daß diese Farbstoffe adsorbiert werden; denn die V_e -Werte für G 50 und G 75 liegen weit oberhalb der Summe von $V_o + V_i$ und außerhalb der Fehlergrenze.

Interessant ist, daß der entsprechende Wert bei Sephadex G 25 deutlich innerhalb dieser Summe liegt. Das läßt sich nur so erklären, daß diese Farbstoffe kaum in die Poren eindringen, für sie also $K_d \approx 0$ ist und damit V_e eigentlich $\approx V_o \approx 6,4$ ml sein müßte, sich aber infolge Adsorption auf 9,8 ml erhöht. Man kann dies als ein Hinweis auf ein Molekulargewicht dieser Farbstoffe von ≈ 5000 ansehen. Doch sollte man dann bei Sephadex

G 50 eine viel stärkere Adsorption als bei Sephadex G 25 erwarten, die sich in einem deutlichen Voranlaufen der Verunreinigungen ausdrücken müßte. Diagramm 2 (Abb. 8) zeigt aber, daß dies nicht ganz der Fall ist. Eine Erklärung hierfür gibt das Gesamtvolumen V_t Tabelle 2 zweite Spalte. Es gibt an, welches Volumen ein Gramm Sephadex nach dem Quellen in einem Überschuß von Wasser einnimmt. Man sieht, daß die Quellvolumina mit fallender Vernetzung stark zunehmen. Das bedeutet aber, daß in der Gelvolumeneinheit immer weniger Sephadex enthalten ist, die Adsorptionszentren also immer weniger werden. Setzt man die Konzentration von Sephadex G 25 gleich 1 so ist sie für

Sephadex G 50 : 0,5

Sephadex G 75 : 0,38

usw.

Es steht also einem Gewinn an adsorbierender Oberfläche ein Verlust an adsorbierenden Zentren gegenüber. Dies ist sicherlich auch der Grund für die Ähnlichkeit der V_e -Werte für Sephadex G 50 und Sephadex G 75.

Wenn die Farbstoffe an Sephadex adsorbiert werden, dann sollte diese Adsorption durch Methanolzusatz verstärkt werden. Bei 10 % Methanolzusatz lassen sich folgende V_e -Werte berechnen unter der Annahme, daß die Sephadexdaten noch dieselben sind wie für reines Wasser:

	V_e [ml]	
	A	E
Sephadex G 25	10,4	22,8
Sephadex G 50	16	27,2

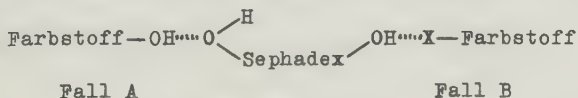
Es zeigt sich ein deutlicher Anstieg der Elutionsvolumina. An der Wechselwirkung zwischen Farbstoffe und Sephadex sind sicherlich die OH-Gruppen des Sephadex beteiligt. Wenn man sie acetyliert, sollten die Farbstoffe leichter eluiert werden. Da das acetylierte Sephadex in Wasser nicht mehr quillt, lassen sich die Verhältnisse nicht mit denen des unbehandelten vergleichen. Schon eher mit Sephadex in 60 proz. Methanol, in dem es

kaum noch quillt. Mit 60 proz. Methanol als Lösungsmittel beträgt das Elutionsvolumen beim acetylierten Sephadex nur 1/5 von dem des nichtacetylierten. Damit ist die Adsorption als Ursache für das Versagen der Gelfiltration an Sephadex klar erwiesen.

Der Gedanke liegt nun nahe diese ausgeprägte Störung zu einer Reinigungsmethode heranzuziehen. Denn Sephadex bietet folgende Vorteile:

1. Es ist farblos und läßt darum die Farbstoffe gut erkennen.
2. Es gestattet das Arbeiten in Wasser bzw. Wasser-Methanol-Gemischen.
3. Die Adsorption der Farbstoffe ist reversibel.
4. Die Säulen laufen verhältnismäßig schnell; darin liegt z. B. der Vorteil gegenüber Stärke.

Da es sich bei den Farbstoffen, wie die elektrophoretischen Versuche gezeigt haben, um saure Verbindungen handelt, die je nach P_H -Wert der Lösung mehr oder weniger als Anionen vorliegen, kommen zwei Typen von Wasserstoffbrücken für die Adsorption in Frage:



X = zur Wasserstoffbrückenbindung befähigte Gruppe

Das Ziel des Versuches, die Adsorption der Farbstoffe an Sephadex zu einer Isolierungsmethode zu benutzen besteht daher darin, diese beiden Adsorptionsmöglichkeiten A und B in ihrer Wirkung zu variieren.

IV Variationen der Adsorption der Farbstoffe an Sephadex

1. Chemische Variationsmöglichkeiten

Chemische Variationsmöglichkeiten im Falle A kommen nicht in Betracht, da sie zu unsicher sind oder zu keinem Erfolg führen (siehe II, 2e). Der Fall B erschöpft sich mit der Acetylierung der OH-Gruppe von Sephadex und wird im weiteren nur im Zusammenhang mit den physikalischen Variationsmöglichkeiten erwähnt.

2. Physikalische Variationsmöglichkeiten

a) Adsorption und Polarität des Lösungsmittels

Wenn sich bei Verwendung von Lösungsmitteln mit niedriger Polarität die Wechselwirkung der Farbstoffe mit Sephadex stärker erhöht als die der meisten Verunreinigungen, so kann man diesen Effekt zu einer Reinigung heranziehen. Löslichkeit und Beständigkeit der Farbstoffe lassen nur Methanol/Wasser-Gemische zu, und hier auch nur bis zu 50 % Methanol. Tabelle 2 zeigt die Ergebnisse:

% Meth.	0		10		20		30		40		50	
	Fst.	Ver.	Fst.	Ver.	Fst.	Ver.	Fst.	Ver.	Fst.	Ver.	Fst.	Ver.
G 25	vT	10,5 27	12 42	5,5 19,5	5,5 17,5	4,5 18	3,5 67					
	hT	89,5 73	88 58	94,5 80	94,5 80,5	95,5 79,5	96,5 33					
G 50	vT	7,5 16	20,5 45	13,5 46,5	17,5 73	16 73	13,5 86					
	hT	92,5 80	79,5 55	86,5 53,5	82,5 27	84 27	86,5 14					

Tabelle 4

Die Werte kommen folgendermaßen zustande: Die Zone der Farbstoffe ist durch einen Schnitt bei x in Abb. 6 (Seite 18) in einen vorderen Teil (v.T.) und einen hinteren Teil (h.T.) aufgetrennt worden. In diesen beiden Teilen sind die Gesamttextinktion ($\epsilon_{480}^s \cdot \text{Gewicht}$) für $\lambda = 480 \text{ m}\mu$ angegeben in Prozent der Ausbeute (Die Ausbeute ist darum als Bezug gewählt, da sie nicht bei allen Säulen

gleich ist, so daß es beim Bezug auf die Ansatzmenge zu Unregelmäßigkeiten käme.) und die Verunreinigungen in Prozent des Ansatzes. Dabei ist das Gewicht der Verunreinigungen immer gleich dem Gesamtgewicht gesetzt, da das Gewicht der Verunreinigungen viel größer als das der Farbstoffe ist. Zum vorderen Teil gehört auch der farblose Vorlauf. Die Säulen mit 50 % Methanolzusatz zeigen deutlich den erwarteten Effekt. Bei der Sephadex G 25 Säule könnte man 67 % der Verunreinigungen abtrennen, bei nur 3,5 % Farbstoffverlust bezogen auf die Ausbeute, die in diesem Fall 95 % beträgt. Am deutlichsten wird der Reinigungseffekt bei der Sephadex G 50-Säule, wenn man die Verhältnisse für die einzelnen Fraktionen betrachtet, wie sie Abb. 10 wiedergibt. (Abb. 10 siehe Seite 24.)

Zwei deutliche Sprünge in der Reihe von Sephadex G 25 sind bemerkenswert: bei 10/20 % und 40/50 % Methanolzusatz. Zwischen 20 und 40 % Methanolzusatz scheinen die Verunreinigungen deutlich relativ zu den Farbstoffen verlangsamt. Dies läßt sich erklären, wenn man wiederum annimmt, daß die Farbstoffe nicht merklich in Sephadex G 25 eindringen. Bei 10 % Methanolzusatz ist das Sephadex noch vollständig wie in reinem Wasser gequollen: Die Farbstoffe werden an der äußeren Oberfläche der Gelkörper und an der inneren, soweit sie ihnen zugänglich ist, adsorbiert. Da sie stärker als die meisten Verunreinigungen adsorbiert werden, wandern diese relativ schneller. Der Unterschied ist allerdings noch nicht sehr viel größer als in reinem Wasser. Bei 20 % Methanolzusatz ist die Gelpartikel um so vieles geringer gequollen, daß die Farbstoffe jetzt nicht mehr eindringen können. Ihre Adsorption ist zwar stärker als die der Verunreinigungen, aber denen steht eine größere Oberfläche offen. Diese überkompensiert die schwächere Wechselwirkung, so daß die Verunreinigungen verlangsamen. Erst wenn in 50 proz. Methanol Sephadex nicht mehr nennenswert quillt und den kleineren Verunreinigungen auch nur noch die äußere Geloberfläche zur Verfügung steht, zeigt sich der wirkliche Adsorptions-

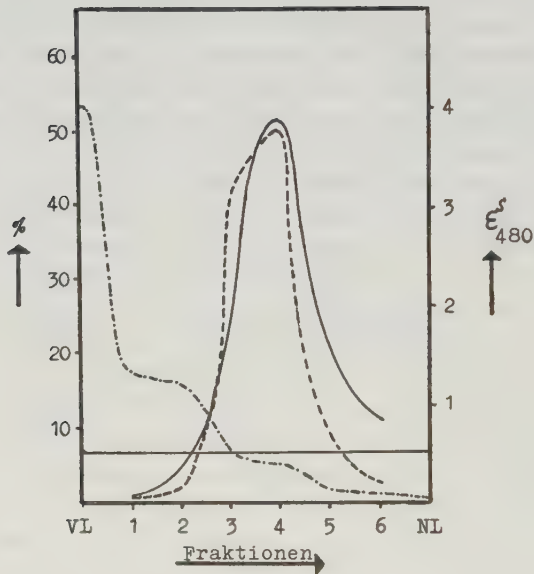


Abb. 10 Chromatographie an Sephadex G-50 mit 50 proz. Methanol

- Verlauf der spezifischen Extinktion ϵ_{480}^s
- Verlauf des Farbstoffgehaltes in %
- · - · - Verlauf der Verunreinigungen in %

Die Berechnung der Kurven ist dieselbe wie bei Abb. 7-9

unterschied: der größte Teil der Verunreinigungen läuft merklich schneller. Dieser Effekt des partiellen Quellens von Sephadex in bestimmten Lösungsmitteln ist von Porath und Lindner²²⁾ zur Variation der Porengröße und zu Trenneffekten ausgenutzt worden. Bezeichnenderweise fehlen diese Brüche bei Sephadex G 50 oder sind zumindest zu höheren Methanolgehalten verschoben. Die Gleichheit der Zahlenwerte bei 30 und 40 % Methanolzusatz dürfte ihre Ursache in dem eben Dargelegten haben. Die Ähnlich-

keit der Werte für die Verunreinigungen bei 10 und 20 % Methanolzusatz beruht darauf, daß der Wert bei 10 % Methanolzusatz zu hoch liegt für v.T., der Farbstoffwert für v.T. ist nämlich auch höher als der bei 20 % Methanolzusatz. Man hat also auf Grund dieser Überlegungen einen weiteren Hinweis auf das Molekulargewicht von ungefähr 5000, diesmal für alle Farbstoffe.

Der Reinigungseffekt ist im Durchschnitt bei Sephadex G 50-Säulen mit Methanolzusatz größer als bei Sephadex G 25. Doch scheint bei Sephadex G 25 die Beständigkeit der Farbstoffe größer zu sein. Während sich bei Sephadex G 25 bei 60 % Methanolzusatz deutliche Zerfallerscheinungen zeigen, werden diese bei Sephadex G 50 schon bei 40 % Methanolzusatz merklich.

b) Adsorption und Ionenausschluß

Es ist bekannt, daß bei quellfähigen Ionenaustauschern in einer Elektrolytlösung die Elektrolytkonzentration im Innern kleiner ist als in der äußeren Lösung. Bei Dowex 50 haben Bauman und Eichhorn²³⁾ für Salzsäure eine in Abb. 11 wiedergegebene Verteilung gefunden:

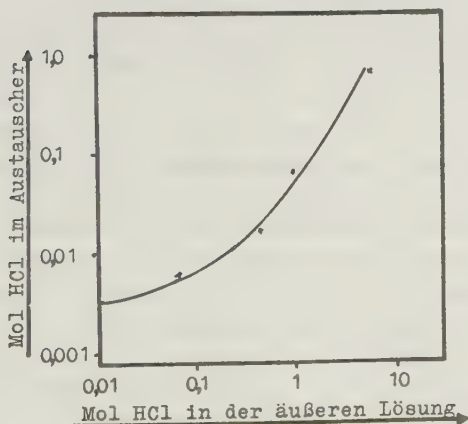


Abb. 11

Man kann diesen unvollständigen Konzentrationsausgleich erklären, wenn man auf das Elektrolytgleichgewicht bei Ionenaustauschern die Vorstellung eines Donnan'schen Membrangleichgewichts überträgt: An die Stelle der Kolloidionen treten die auf der Gelmatrix feststehenden Ionen, die Membrane ist als bloße Phasengrenze²⁴⁾ zwischen der inneren und äußeren Phase zu denken. Auch für das Donnan-Gleichgewicht muß für den Gleichgewichtsfall die Forderung der Elektroneutralität und des Minimums der freien Energie bei isothermen, reversiblen und volumenkonstanten Bedingungen erfüllt sein. Im Falle eines Kationenaustauschers in der Na^+ -Form und eines Elektrolytpaares einwertiger Ionen, wie z. B. Natriumchlorid, läßt sich daher für die Konzentrationsverhältnisse folgende Beziehung ableiten. Die Ableitung im einzelnen bringt Literaturzitat²⁵⁾.

$$\frac{[\text{NaCl}]_a}{[\text{NaCl}]_i} = 1 + \frac{c_i}{c_a} \quad (1)$$

Hierin bedeutet $[\text{NaCl}]_a$ die Natriumchlorid Konzentration in der äußeren Lösung und $[\text{NaCl}]_i$ die im Innern des Austauschers; beide gelten für den Gleichgewichtszustand. c_i ist die Konzentration der feststehenden Austauscherionen und c_a stellt die Anfangskonzentration von Natriumchlorid in der äußeren Lösung dar.

Man sieht, daß bei einer gegebenen anfänglichen Außenkonzentration c_a die Konzentration der eingedrungenen Elektrolyte umgekehrt proportional ist der der im Austauscher feststehenden Ionen. Für eine 1 molare Austauscherionenkonzentration und einer 0,1 molaren äußeren Anfangskonzentration eines Elektrolyten errechnet sich mit Gleichung (1) eine Konzentration der eingedrungenen Ionen von $0,0083 \text{ Mol} \cdot \text{l}^{-1}$ oder 8,3 % bezogen auf die äußere Elektrolytmenge zu Beginn. Wieweit Gleichung (1) im einzelnen in der Praxis quantitativ¹³⁾ erfüllt ist, spielt für das Folgende keine Rolle, sondern sie dient lediglich zum qualitativen Verständnis der Reinigungs-

methode, die auf sie aufbaut.

Während nämlich Elektrolyte vom Ionenaustauscherinnern weitgehend ferngehalten werden, gilt das für Nichtelektrolyte nicht, zumindest lange nicht in dem Maße. Man kann daher einen Ionenaustauscher zur Trennung von Elektrolyten und Nichtelektrolyten benutzen, wie das Wheaton und Baumann²⁶⁾ mit dem Kationenaustauscher Dowex 50 getan haben.

Eine Variation der Adsorption der Farbstoffe an Sephadex besteht nun in der Verwendung des Kationenaustauschers auf Sephadex-Basis. Auf Grund des Ionenausschlusses müßte eine Adsorption im Gelinnern weitgehend ausgeschaltet sein. Ferner sollte eine Adsorption an der Oberfläche der Gelkörper wegen der elektrostatischen Abstoßung ebenfalls stark vermindert sein.

In Betracht kommen die Ionenaustauscher CM-Sephadex C-25 und SE-Sephadex C-25, der erste enthält Carboxylgruppen, der zweite Sulfogruppen. Bei beiden liegt die Ausschußgrenze für Stoffe mit Molekulargewichten über 10000. Die Kapazität ist für den CM-Sephadex-Austauscher mit 4 - 5 Milliäquivalent pro Gramm Austauscher angegeben, für den SE-Sephadex-Austauscher mit 2 - 2,5 Milliäquivalent pro Gramm Austauscher, d. h. die Kapazität des ersteren ist doppelt so hoch und damit die Konzentration der am Austauscher festsitzenden Ionen ebenfalls. Da nach Gleichung (1) die Konzentration der eingedrungenen Ionen der Konzentration der festsitzenden Austauscherionen umgekehrt proportional ist, verspricht der CM-Sephadex-Austauscher bessere Ergebnisse. Dies ist auch tatsächlich der Fall. Alle weiteren Überlegungen beziehen sich daher auf den CM-Sephadex-Austauscher.

Ein weiterer Gesichtspunkt ist der P_H -Wert im Ionenaustauscher, er ist gegeben mit der Wahl des Gegenanions. Da ein geringfügiges Eindringen der Farbstoffe in den Austauscher anzunehmen ist und da sie oberhalb P_H 8 recht unbeständig sind, scheidet Natrium als Gegenion aus. Ferner kommt hinzu, daß bei P_H 8 - 9 auch

die ziemlich schwachen Protolyte dissoziieren und so auch dem Ionenausschluß unterliegen. Als Gegenion kommt deshalb das Ammoniumion NH_4^+ in Frage, bei dem der p_H -Wert um 7 liegt. Bei ihm sind der Reinigungseffekt und die Ausbeute höher als bei der Na^+ -Form des Austauschers. Das Diagramm (Abb. 13) zeigt deutlich den Effekt, der von einem schnelleren Wandern der Farbstoffe zu erhoffen ist. Als Chromatographiermittel dient reines Wasser.

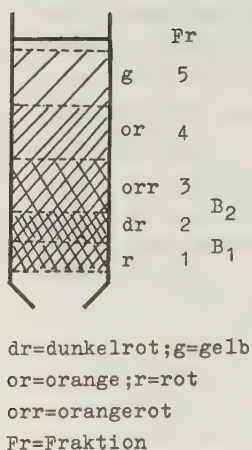


Abb. 12
Chromatogramm auf
CM Sephadex C-25
 NH_4^+ -Form

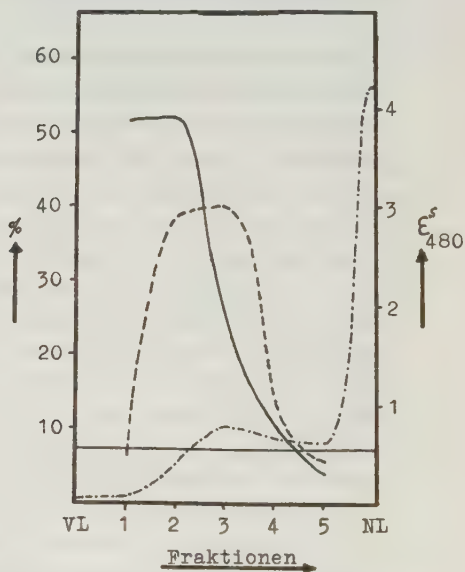


Abb. 13 Chromatographie an CM-Sephadex
C-25 NH_4^+ -Form mit Wasser

— Verlauf der spezifischen Extinktion ϵ_{480}^s
 ---- Verlauf des Farbstoffgehaltes in %
 -.-.- Verlauf der Verunreinigungen in %
 Die Berechnung der Kurven ist dieselbe wie bei
 Abb. 7 - 9.

In der Zone der Farbstoffe befinden sich 31 % der Verunreinigungen des Ansatzes. Das Ergebnis läßt sich durch geringfügiges Schneiden am Ende der Zone noch verbessern. Glucose liegt ganz im Nachlauf und ebenso finden sich dort die meisten Aminosäuren, nur zwei sind in der 4. und 5. Fraktion nachweisbar.

Geht man davon aus, daß eine Adsorption der Farbstoffe im Falle B nicht auszuschließen ist, dann sollte eine Acetylierung des Ionenaustauschers die Wanderungsgeschwindigkeit der Farbstoffe noch erhöhen. Ein acetylierter CM-Sephadex-Austauscher hat das gleiche Quellvermögen wie ein nichtacetylierter, dennoch liegen die Ergebnisse anders als erwartet. Während beim nichtacetylierten Austauscher in der NH_4^+ -Form das Verhältnis von Gewicht der Farbstofffraktionen zum Gewicht des farblosen Nachlaufs 1:3 beträgt, verschlechtert es sich beim acetylierten auf 1:1; d. h. durch Acetylieren des Austauschers werden Teile der Verunreinigungen schneller. Man hat daher auch für sie eine Adsorption an Sephadex anzunehmen, was bei einem hydrophilen Rohextrakt nicht weiter verwunderlich ist. So gesehen stellt der nichtacetylierte Kationenaustauscher einen optimalen Kompromiß dar zwischen minimaler Adsorption der Farbstoffe und maximaler Adsorption eines Teils der Verunreinigungen. Diesen Fall auch für das neutrale Sephadex G 25 durch partielles Acetylieren zu erreichen, führt zu keinem brauchbaren Erfolg. Zwar zeigt sich der erwünschte Effekt in einem Anstieg des Nachlaufs von 0,5 % auf 12 % des Ansatzes, doch ist dies für eine Reinigung ungenügend. Die Ursache des Scheiterns liegt vielleicht darin, daß das Sephadex in gequollenem Zustand (in Formamid) acetyliert wurde, dabei werden auch die inneren OH-Gruppen verestert und entfallen für eine Adsorption der Verunreinigungen. Auch sinkt mit stärkerer Acetylierung das Quellvermögen von Sephadex, so daß auch die Verunreinigungen ausgeschlossen werden. Man hätte diese Schwierigkeiten wahrscheinlich vermeiden können, wenn man das Sephadex in nicht gequollenem

Zustand eingesetzt hätte, z. B. in einer Suspension von Pyridin oder Benzol. Dann hätten lediglich die OH-Gruppen an der Oberfläche reagiert, die für die Adsorption der Farbstoffe verantwortlich sind.

c) Adsorption und Azidität

Die unter Abschnitt a und b beschriebenen Adsorptionsvariationen führen zu einem angereicherten Farbstoffgemisch. Für eine Isolierung der Farbstoffe ist es aber nötig, sie nicht nur von den Verunreinigungen zu befreien, sondern auch von einander zu trennen. Da es sich bei den Farbstoffen um Säuren handelt, bietet sich eine Trennung auf Grund ihrer eventuell unterschiedlichen Adsorption auf Sephadex als Folge einer unterschiedlichen Azidität an. Es geht daher um die Frage, ob die bisher gezeigte schwache Auftrennung an normalen Sephadex auf einer unterschiedlichen Azidität beruht.

Bei den bisherigen Versuchen sind die Farbstoffe so eingesetzt worden, wie sie im Rohextrakt vorliegen, d. h. wahrscheinlich als Kalium-Salz. Die wäßrigen Lösungen dieser Rohextrakte haben einen mit der Glaselektrode bestimmten P_H -Wert von 6,5. Beim Chromatographieren mit reinem auf einem Ionenaustauscher entsalzten Wasser P_H 5,6 ist also mit einem P_H -Wert von ungefähr 6 zu rechnen, bei Methanolzusatz liegt er etwas höher. Nimmt man für die P_K -Werte der Farbstoff-säuren einen Bereich von 3 - 5 an und betrachtet alle als einwertige Protolyte, so kann man auf Grund der Henderson-Hasselbalch'schen Gleichung

$$P_H = P_{K_{HA}} + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

$[A^-]$ = Konzentration des Säureanions

$[HA]$ = Konzentration der undissoziierten Säure HA

sagen, daß unter diesen Bedingungen die Farbstoffe bis auf die schwächeren praktisch vollständig dissoziiert sind, eine Unterschiedlichkeit in der Azidität also gar nicht zum Tragen kommen kann.

Nun ist aber auffallend, daß die Reihenfolge der Farbstoffe bei normalen Sephadex anders ist als beim Kationenaustauscher in der NH_4^+ -Form und bei der Elektrophorese im "Elphor VaP" - von einer Reihenfolge der Farbstoffe kann bei der unvollständigen Trennung nur beim Vergleich der orangefarbenen mit den längerwellig absorbierenden gesprochen werden. In der Elektrophorese und beim Kationenaustauscher erfolgt die Trennung nach der Ladung, die Reihenfolge ist darum ähnlich: B_1 vorne, B_2 in der Mitte. Wenn die Auftrennung beim Kationenaustauscher aber auf der Ladung beruht, dann sollte man eine so große, wenn auch unscharfe, Auftrennung nicht erwarten, falls man von einwertigen Protolyten ausgeht und die Dissoziationsverhältnisse bei p_H 7 (Kationenaustauscherinneres) berücksichtigt. Es liegt also nahe anzunehmen, daß nicht alle Farbstoffe protolytisch gleichwertig sind. Die Auftrennung am Kationenaustauscher läßt sich dann mit verschiedenwertigen Ionen erklären. Denn ein mehrwertiges Anion wird aus demselben Grund stärker ausgeschlossen und damit schneller wandern, aus dem ein mehrwertiges Kation bevorzugt aufgenommen wird. Dieses überführt pro Ladung weniger Hydratwasser und kommt damit dem Bestreben der Gelmatrix - anschaulich gesprochen - sich zusammenzuziehen entgegen. Im vorliegenden Fall müßten auf Grund der Elektroneutralität z. B. bei einem zweiwertigen Anion zwei stark hydratisierte NH_4^+ -Ionen mit überführt werden, bei einem einwertigen Anion nur eins. Dies bedeutet, daß für den Übertritt eines mehrwertigen Anions in die innere Phase mehr Energie aufgewandt werden muß. Kongorot als Disulfonsäure und β -Naphthol als Monosulfonsäure lassen sich so auf dem Kationenaustauscher in der NH_4^+ -Form in zwei unscharfe Zonen trennen, wobei Kongorot vorne läuft.

Eine verschiedene Wertigkeit der Farbstoffe läßt nun auch eine Auftrennung der Farbstoffe auf normalem Sephadex auf Grund unterschiedlicher Azidität zu. Beruht nämlich die unterschiedliche Adsorption der Farb-

stoffe untereinander auf der Adsorption der undissoziierten Hydroxylgruppe an Sephadex, so besitzt eine höherwertige Säure wegen ihrer schwächer dissoziierten weiteren Stufen mehr OH-Gruppen pro Mol und wird darum stärker adsorbiert und damit langsamer wandern. Beim Ionenaustauscher und in der Elektrophorese erfolgt die Trennung nach der Ladung, da diese bei der höherwertigen Säure pro Mol größer ist, wandert sie diesmal schneller.

Wieweit Azidität und Ladung der Farbstoffe jede für sich allein zu einer Trennung der Farbstoffe herangezogen werden können, zeigen Abschnitt a und b. Es sollte nun möglich sein, eine genügende Trennung zu erzielen, wenn man die Unterschiede in Azidität und Ladung gleichzeitig ausnützt.

Eine Möglichkeit dafür bietet die Verwendung des Anionenaustauschers in der H^+ -Form. Bei ihm werden am oberen Ende der Säule infolge Ionenaustausches die Farbstoffe in die freien Säuren übergeführt, dadurch fällt der P_H -Wert der Probelösung. Je nach Azidität unterliegen dann die Farbstoffsäuren dem Ionenausschluß und damit der Adsorption an die Gelmatrix. Durch den Effekt des Ionenausschlusses wird also der Unterschied in der Adsorption auf Grund der Azidität allein verstärkt.

Entscheidend für die Trennung von Protolyten ist dabei der P_H -Wert im Ionenaustauscher. Dies zeigen die Trennergebnisse einer Versuchsreihe, die Wheaton und Baumann²⁶⁾ durchgeführt haben. Ihr Ziel ist es, jeweils binäre Gemische aus Trichloressigsäure (I), Dichloressigsäure (II), Monochloressigsäure (III) und Essigsäure (IV) auf Dowex 50 zu trennen. Auf Grund der Dissoziationsgrade (α) 0,25 molarer Lösungen:

	K [mol/l]	α in %
I	2×10^{-1}	58
II	5×10^{-2}	35
III	$1,4 \times 10^{-3}$	7,2
IV	$1,75 \times 10^{-5}$	0,8

sollte man zwischen II und III ($\alpha_{II} - \alpha_{III} = 27,8 \%$) und II und IV ($\alpha_{II} - \alpha_{IV} = 34,2 \%$) eine bessere Trennung erwarten als zwischen I und II ($\alpha_I - \alpha_{II} = 23 \%$). Genau das Gegenteil ist der Fall. Dies läßt sich einfach erklären, wenn man die Dissoziationsgleichgewichte im Austausch bei einem P_H -Wert von ≤ 1 berücksichtigt. Danach sind III und IV wegen ihrer kleinen Dissoziationskonstanten (K) praktisch undissoziiert, II sollte schwach dissoziiert sein und I gut. Eine gute Trennung sollte zu erwarten sein zwischen I und II, III, IV, eine mäßige zwischen II und III, IV und keine zwischen III und IV. Die Ergebnisse bestätigen dies.

Von den Ionenaustauschern auf Sephadexbasis stehen wieder SE-Sephadex C-25 und CM-Sephadex G 25 zur Auswahl. Die beiden nachstehenden Diagramme Abb. 14 und 15

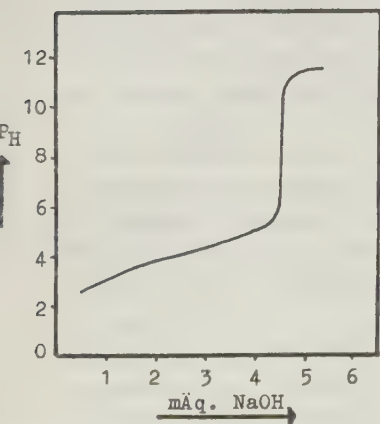


Abb. 14 Titration von CM-Sephadex C-25 in 1n KCl

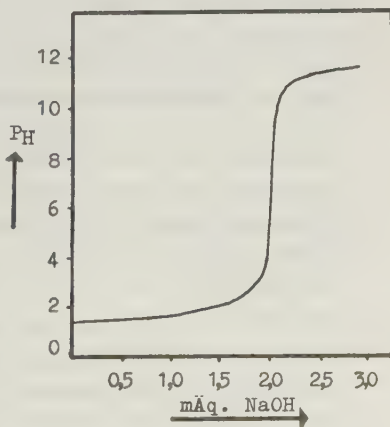
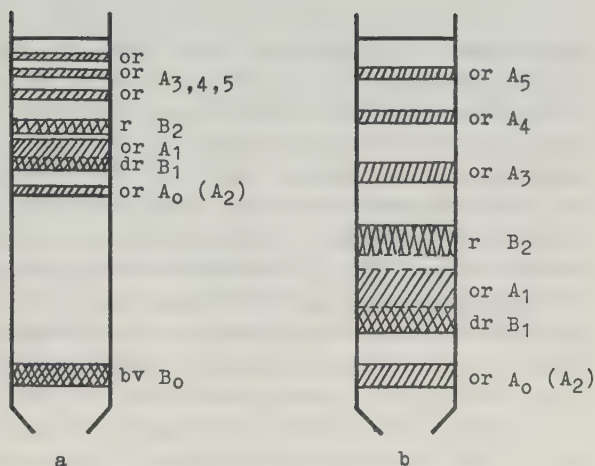


Abb. 15 Titration von SE-Sephadex C-25 in 1n KCl

weisen den ersteren als starke Säure aus, den zweiten als schwache Carbonsäure mit einem P_K -Wert von ungefähr 4. Auf Grund von Gleichung (1), Seite 26, erscheint zwar diesmal der SE-Sephadex-Austauscher der geeigneteren, da die stärker sauren Sulfogruppen stärker dissoziiert sind als die Carboxylgruppen des anderen und somit eine höhere Ionenkonzentration im Austauscher bilden, doch bei einem P_H -Wert von ≤ 1 im Innern des Austauschers sind alle Farbstoffsäuren undissoziiert, d. h. die Voraussetzungen für einen differenzierenden Ionenausschluß und Aziditätsunterschied sind gar nicht gegeben. Der Versuch zeigt keine Auftrennung. Ganz allgemein spricht gegen die Verwendung stärker saurer Kationenaustauscher die Möglichkeit einer chemischen Veränderung an der Farbstoffmolekel, z. B. Hydrolyse einer glykosidischen Bindung.

Beim schwach sauren CM-Austauscher liegt der P_H -Wert im Innern bei ≥ 2 . Dieser sollte zu einer Differenzierung der stärkeren Farbstoffprotolyte noch geeignet sein, aber auf jeden Fall zur Unterscheidung von stärkeren und schwächeren. Der Versuch zeigt eine gute und scharfe Fraktionierung der Farbstoffe zu Beginn des Chromatographierens. Im weiteren Verlauf verbreitern sich die Zonen, wodurch die Trennung etwas beeinträchtigt wird. Abb. 16 zeigt ein solches Chromatogramm. Da es sich bei der Ausgangssubstanz um einen durch Wasserextraktion gewonnenes Rohprodukt (Jahrgang 1965) handelt, findet sich hier ein dritter Farbstoff (B_0) mit einem längerwelligem Absorptionsmaximum.

Das Chromatogramm a zeigt die Trennung im ersten Teil der Laufzeit, Chromatogramm b gegen Ende. Es lassen sich deutlich drei Abschnitte erkennen. Läßt man den ersten Abschnitt mit B_0 unberücksichtigt, so ergeben die anderen beiden zusammen das Chromatogramm vom Kationenaustauscher in der NH_4^+ -Form, nur fraktioniert. Die Trennung zwischen den stärkeren Farbstoffsäuren B_1 , A_1 , B_2 von den schwächeren A_3 , A_4 , A_5 ist sehr



bv = blauviolett; dr = dunkelrot; or = orange; r = rot

Abb. 16 Chromatogramm auf CM-Sephadex C 25 H⁺-Form

gut, die Fraktionierung innerhalb der stärkeren ausreichend. Schwierig ist allein die Zuordnung von A₀. Seiner Konzentration nach müßte er mit A₂ aus der Elektrophorese identisch sein.

Eine Erklärung für die Zonenverbreiterung kann man in der Abhängigkeit der Wanderungsgeschwindigkeit der Farbstoffe von ihrem Dissoziationsgrad α suchen. Es ist ohne weiteres einzusehen, daß eine stärker dissoziierte Säure unter den oben ausgeführten Bedingungen schneller wandert. Eine Beziehung für α erhält man durch Einsetzen in das Dissoziationsgleichgewicht:

$$\frac{\alpha^2 \cdot c}{1 - \alpha} = K$$

c = Totalkonzentration eines Protolyten

K = Dissoziationskonstante

Unter der vereinfachenden Annahme, daß $\alpha \ll 1$ erhält man folgende Beziehung für α :

$$\alpha = \sqrt{\frac{K}{c}}$$

Da es nun infolge Diffusion innerhalb einer Zone zu einem Konzentrationsgefälle kommt, wandert eine Zone nicht einheitlich. Dies wiederum führt zu weiterer Verdünnung. Bezeichnend hierfür ist, daß die Verbreiterung nur in Flußrichtung erfolgt. Sie ließe sich wahrscheinlich vermeiden, indem man mit verdünnter Essigsäure als Puffer chromatographiert. Dies würde aber bedeuten, daß man reines Wasser als Chromatographiermittel verläßt. In der Praxis läßt sich diese Störung durch wiederholtes Chromatographieren an kurzen Säulen (15 cm) bereinigen, was außerdem rasches Arbeiten gewährleistet. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Reihenfolge der Farbstoffe bestimmt wird von der Abhängigkeit des Dissoziationsgrades α von $\sqrt{K}$ und die Zonenverbreiterung von der Abhängigkeit des Dissoziationsgrades α von $\sqrt{\frac{1}{c}}$.

Chromatographiert man unter den ausgeführten Bedingungen eine Mischung von Kongorot und β -Naphtholorange (als Salzlösung aufgetragen), so erhält man eine vollständige und scharfe Trennung bereits innerhalb der dreifachen Strecke der Anfangszone. Kongorot wandert vorne.

Die Ergebnisse am CM-Sephadex-Kationenaustauscher in der H^+ -Form sind nicht nur hinsichtlich der Trennung der Farbstoffe interessant, sondern auch hinsichtlich ihrer Reinigung. Da der Austauscher nur schwach dissoziiert ist, wird der Effekt des Ionenausschlusses abgeschwächt. Damit wird eine Adsorption im Falle A und B wieder möglich. Fall A wird durch das Vorliegen der freien Säure noch verstärkt. Daher geht die höhere Wanderungsgeschwindigkeit der Farbstoffe auf dem Austauscher in der NH_4^+ -Form gegenüber dem größten Teil der Verunreinigungen verloren. Am deutlichsten zeigt sich dies in einem Vergleich der farblosen Vor- und Nachläufe beider Säulen in Prozent bezogen auf die

Ausbeute der Verunreinigungen. (Die Ausbeute ist gewählt, da beim Chromatographieren mit reinem Wasser auf beiden Säulen ein Teil der Verunreinigungen hängen bleibt, nicht aber die Farbstoffe.)

	Vorlauf %	Nachlauf %
Austauscher in NH_4^+ -Form	0	64
Austauscher in H^+ -Form	46,5	3

Wenn man bedenkt, daß sich beim Austauscher in der H^+ -Form in der 1. Farbstofffraktion bei 28 % Farbstoffe (bezogen auf die Ausbeute für λ_{max} : 480 m μ) weitere 42,5 % der Verunreinigungen befinden, dann sollte sich so neben einer Trennung der Farbstoffe auch eine weitgehende Reinigung der Farbstoffe erzielen lassen.

V. Isolierung der Farbstoffe

Man kann die Isolierung der Farbstoffe auf zwei verschiedenen Wegen vornehmen, man kann sie im Gemisch reinigen und dann trennen oder zuerst trennen und dann reinigen. Die Adsorptionsvarianten nach a und b (III,2) an Sephadex ergeben jede für sich ein angereichertes Farbstoffgemisch in hoher Ausbeute (90 % der eingesetzten Farbstoffmenge). Die Wanderungsgeschwindigkeit der Farbstoffe ist hierbei in bezug auf den Großteil der Verunreinigungen einmal kleiner (a) und das andere Mal größer (b). Es liegt daher nahe, diese beiden Möglichkeiten zu kombinieren, in dem man zuerst auf einer CM-Sephadex C 25-NH₄⁺-Form-Säule chromatographiert und dann auf einer neutralen Sephadex G 25-Säule mit Methanolzusatz. Der erste Versuch³⁾ erbringt ein angereichertes Gemisch mit einer spezifischen Extinktion für $\lambda = 480 \text{ m}\mu$ von 12,15 und für $\lambda = 540 \text{ m}\mu$ von 1,35, das entspricht einer 21,5fachen bzw. 34fachen Anreicherung. Da das IR-Spektrum dieses Gemisches keine Bandenstruktur zeigt, müssen die Farbstoffe als noch sehr verunreinigt angesehen werden.

Ein weiterer Versuch mit einem Rohextrakt von 1964 hat ebenfalls die Anreicherung der Farbstoffe im Gemisch zum Ziel; denn die anfänglichen Versuche mit dem Kationenaustauscher in der H⁺-Form bringen zwar die erwartete Trennung, aber die Ausbeuten sind schlecht (26 % der eingesetzten Farbstoffmenge). Dies ändert sich erst als die Säulenlänge verkürzt (15 cm) und die Durchflußgeschwindigkeit auf der Säule mit Hilfe des Wasserstrahlvakuum erhöht wird.

Als weitere Reinigungsmöglichkeit folgt diesmal der ersten Anreicherung auf dem Austauscher in der NH₄⁺-Form eine Dialyse der gesamten Farbstoffmenge. Dialysiert wird fraktioniert mit einem partiell gequollenem "Cellophan"-Dialysierschlauch in

- | | |
|----------------------|----------|
| 1. reinem Methanol | 12 Stdn. |
| 2. 90 %igem Methanol | 24 Stdn. |

3. 65 %igem Methanol 24 Stdn.
4. reinem Wasser 24 Stdn.

Tabelle 5 zeigt die Ergebnisse. Die Prozente der Verunreinigungen beziehen sich auf den Ansatz, die der Farbstoffe auf die Ausbeute und sind berechnet über die Gesamtextinktion (E^S .Gewicht) bei 480 $m\mu$ bzw. 540 $m\mu$.

	Verun- reini- gungen %	λ_{480} %	E_{480}^S	λ_{540} %	E_{540}^S
Methanol	51	21	0	21	0
90 %iges Methanol	22,5	21	2,55	20,5	0,36
65 %iges Methanol	20,5	62,5	8,25	62	1,25
Wasser	1	2,5	2	3	0,93
Rückstand	3,5	(10) ^x	(7) ^x	(14) ^x	(1,32) ^x

Tabelle 5

x) Die Extinktionskurven haben einen starken Untergrund, enthalten aber noch Farbstoff.

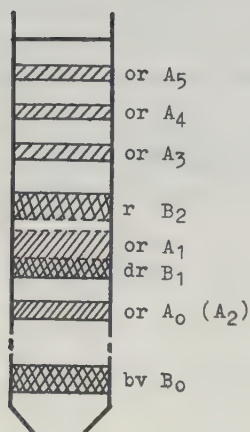
Die Parallelität der Farbstoffwerte für die beiden Hauptfraktionen läßt vermuten, daß es sich bei diesen 2 Fraktionen nur um einen graduellen Übergang - um einen willkürlichen Schnitt also - handelt. Es wird darum nur die bessere Fraktion mit 65 % Methanolzusatz weiter aufgearbeitet. Diese wird erneut auf den Kationenaustauscher in NH_4^+ -Form gegeben, da man hier durch geringfügiges Schneiden am Ende der Farbstoffzone verhältnismäßig viel Verunreinigungen abtrennen kann. Die Hauptfraktion wird dann zweimal auf Sephadex G 50 eingesetzt, wobei mit 30 % Methanolzusatz chromatographiert wird. Nachfolgendes tabellarisches Anreicherungschema faßt noch einmal die Reinigungsschritte zusammen. Angegeben ist ferner die spezifische Extinktion für jeden Schritt:

	ϵ_{480}^s	ϵ_{540}^s
O Rohprodukt	1,03	0,15
I Kationenaustauscher NH_4^+ -Form	3,15	0,46
II Dialyse	8,25	1,22
III Kationenaustauscher NH_4^+ -Form	11,8	1,8
IV Sephadex G 50 30 % Methanolzusatz	15	4,35
V Sephadex G 50 30 % Methanolzusatz	17,75	4,53

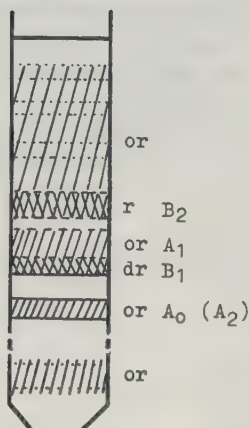
Obwohl die spezifische Extinktion im Vergleich zum ersten Reinigungsversuch von $\epsilon_{480}^s = 12,15$ auf 17,75 bzw. $\epsilon_{540}^s = 1,35$ auf 4,50 gesteigert wird, zeigt das IR-Spektrum weiterhin keine Bandenstruktur.

Ein dritter Versuch zielt auf eine möglichst gute Trennung ab. Das durch ein abgewandeltes Extraktionsverfahren gewonnene Rohprodukt des Jahres 1965 hat bereits eine spezifische Extinktion von $\epsilon_{480}^s = 4,75$ bzw. $\epsilon_{540}^s = 0,92$, allerdings beträgt die ganze Jahresernte nur 500 mg Rohprodukt. Es werden daher beide, das vorherige angereicherte Gemisch und der Rohextrakt parallel getrennt. Auf diese Weise bietet sich außerdem eine Kontrollmöglichkeit für die Identität der Farbstoffe. Abb. 17 und 18 zeigen die Chromatogramme der beiden Ausgangsprodukte.

Wie man sieht, zeigt das Chromatogramm der Aufarbeitung von 1964 (Abb. 18) nicht die scharfe Fraktionierung am Ende, auch fehlt B_0 , aber in den Hauptfarbstoffen A_1 , A_0 , B_1 und B_2 zeigt sich eine vollkommene Übereinstimmung in der Zonenlage. Die Farbstoffe in Abb. 18 vor A_0 und hinter B_2 werden nicht weiter behandelt. Die Fraktionierung erfolgt so, daß B_1 und A_1 zunächst zusammengefaßt werden und erneut wie alle anderen Fraktionen auf dem Kationenaustauscher in H^+ -Form eingesetzt werden. Bereits nach diesem Durchgang liegt die spezifische Extinktion für den orangefarbenen Hauptfarbstoff A_1 über 20, und zwar für beide Ausgangsprodukte. Das Trennverfahren ist damit den Methoden



1965



1964

bv = blauviolett; dr = dunkelrot; or = orange; r = rot

Abb. 17

Abb. 18

Chromatogramme auf CM-Sephadex C 25 H^+ -Form

der Anreicherung an Schnelligkeit, Arbeitsaufwand und Erfolg weit überlegen.

Nach diesen beiden Durchgängen sind die UV-Banden im Sichtbaren für alle orangefarbenen Farbstoffe und die von A_0 klar zu erkennen. Auf Grund gleichen chromatographischen und spektroskopischen Verhaltens, z. T. auch aus Substanzmangel, werden für die Weiterverarbeitung folgende Vereinfachungen durchgeführt:

Von den orangefarbenen Farbstoffen werden nur A_0^{64} , A_1^{64} und A_1^{65} weiter aufgearbeitet. Bei den Farbstoffen mit längerwelligem Maximum erscheint eine Isolierung nur für B_2^{65} erfolgversprechend. Da die Übereinstimmung von B_1^{65} und B_1^{64} in jeder Beziehung gegeben ist, z. B.

$$\underline{B_1^{65}} : \epsilon_{483}^S : 24, \epsilon_{535}^S : 15,5 \text{ und } \underline{B_1^{64}} : \epsilon_{483}^S : 25, \\ \epsilon_{535}^S : 14,5,$$

werden beide vereint.

Die weitere Reinigung bzw. Trennung wird vorgenommen unter dem Gesichtspunkt variierteter Adsorption der Farbstoffe an Sephadex. Das folgende Isolierungsschema faßt noch einmal den gesamten Isolierungsvorgang zusammen:

	I. CM-Seph. C-25 H ⁺ -Form	II. CM-Seph. C-25 H ⁺ -Form	III. neutr. Seph. G 25 Wasser	IV. neutr. Seph. G 25 Wasser + 30 % Meth.
Rohprodukt				
B ₀		+	+	-
A ₀		+	+	-
B ₁			+	+
A ₁			+	-
B ₂		+	+	+
A ₃		+		
A ₄		+		
A ₅		+		

Isolierungsschema

Die Trennung der Farbstoffe führt zu sauberen Maxima der Adsorptionsbanden. Lediglich im Falle von B₁ wird dieses Ziel nicht ganz erreicht. Dies ist aber mehr eine Frage der verfügbaren Substanzmenge als der Methode.

VI. Eigenschaften der Farbstoffe

1. Spektrale Eigenschaften

a) UV-Spektren

Die Spektren sind von den jeweils besten Fraktionen, gemessen direkt nach Verlassen der Säule. Sie sind gleich für alle orangefarbenen Farbstoffe. (UV-Spektren siehe folgende Seiten.)

Alle weiteren Werte enthält Tabelle 6:

	$\lambda_{\max I}$ [m μ]	ϵ_1^S	Anrei- cherung	$\lambda_{\max II}$ [m μ]	ϵ_2^S
B ₀	558	(5)	(5,5 fach)	336	(3,75)
A ₀	478	18,69	17 fach	458 ^S	17,5
B ₁	540	18	117 fach	303	5,7
A ₁ ⁶⁴	478	26,7	26 fach	458 ^S	24,7
A ₁ ⁶⁵	478	25,73	5,5 fach	458 ^S	23,8
B ₂	515	5	5 fach	338	2,2

Tabelle 6

Die Extinktionswerte sind nicht von den besten Fraktionen gemessen, sondern von einer Zusammenfassung mehrerer auch schlechterer Fraktionen. Das führt zu einem zu hohen Wert für das zweite Maximum bei den Farbstoffen B₀, B₁, B₂. Die Werte für B₀ sind irreführend, da dieser Farbstoff beim Trocknen im Hochvakuum bei 60°C weitgehend zerstört wurde. Es lassen sich aber Werte rekonstruieren, die denen von B₁ ähneln.

b) IR-Spektren

Die IR-Spektren in KBr wurden von denselben Proben aufgenommen, von denen auch die Extinktionswerte gemessen wurden. Die IR-Spektren von A₁⁶⁵, B₀, B₂ gleichen den abgebildeten sehr stark. (IR-Spektren siehe Seite 46.)

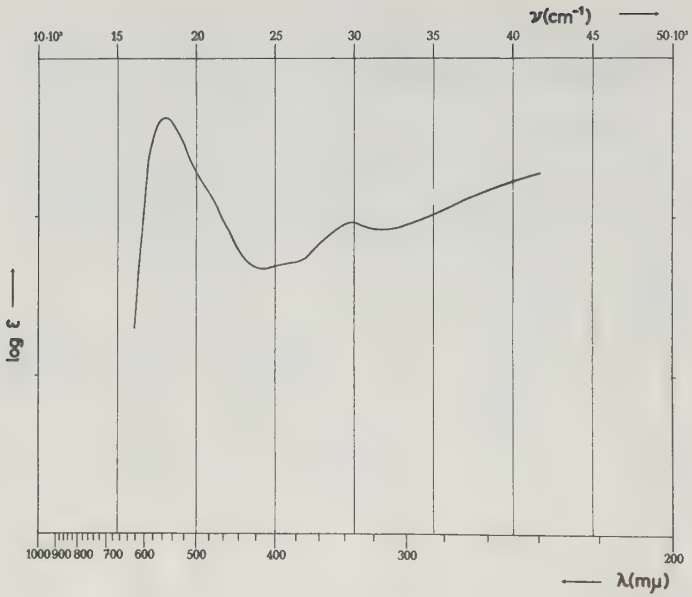


Abb. 19 UV-Spektrum von B_0 in Wasser

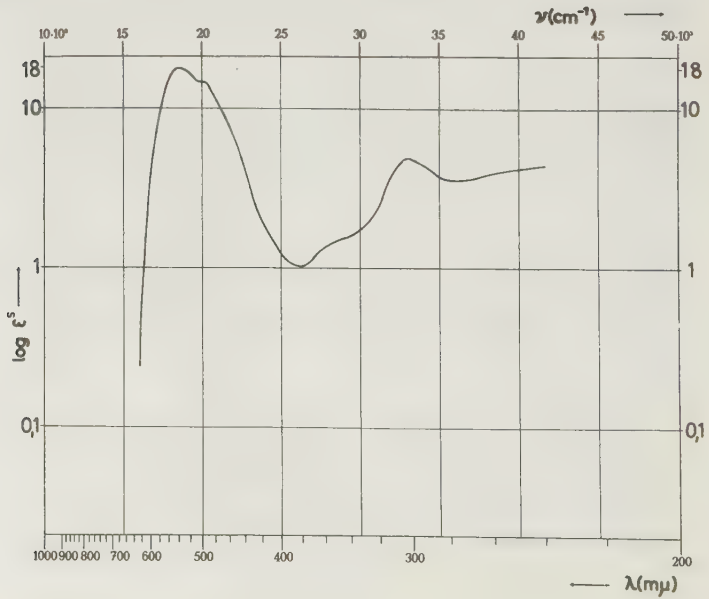


Abb. 20 UV-Spektrum von B_1 in Wasser

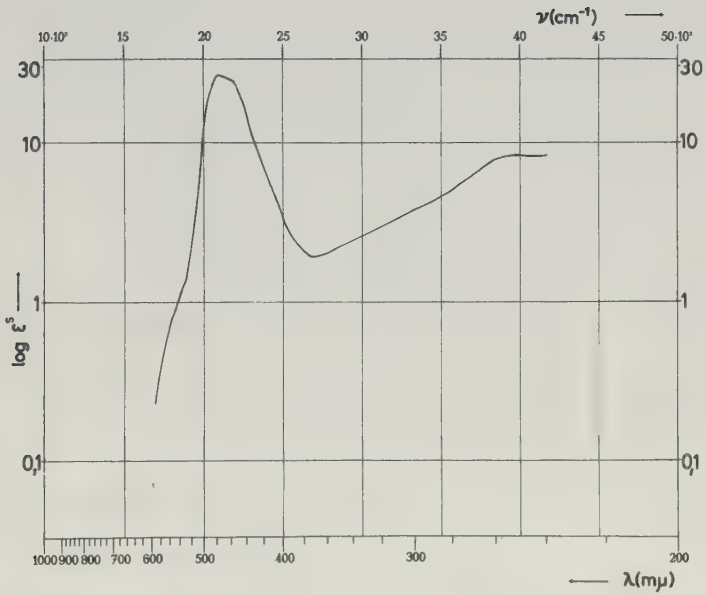


Abb. 21 UV-Spektrum von A_1 in Wasser

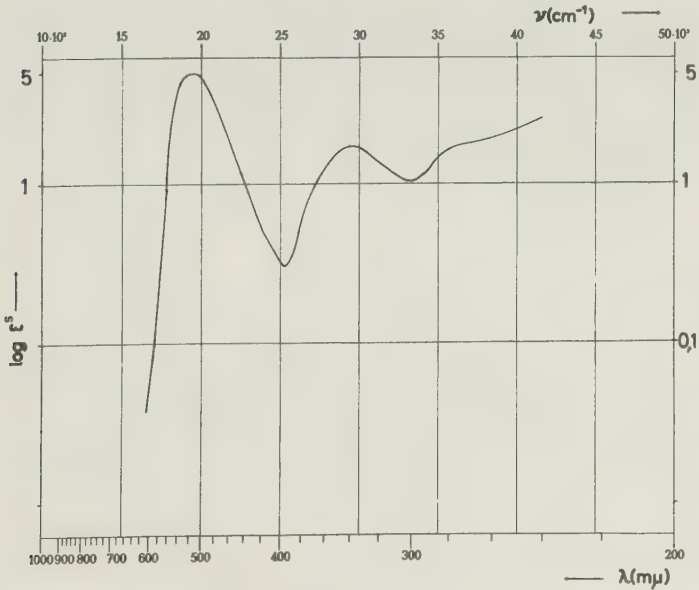


Abb. 22 UV-Spektrum von B_2 in Wasser

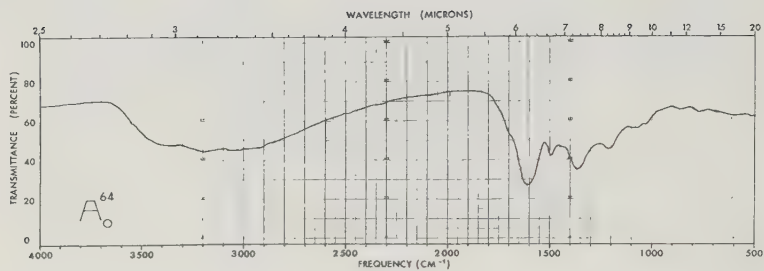


Abb. 23 IR-Spektrum von A_0^{64} in KBr

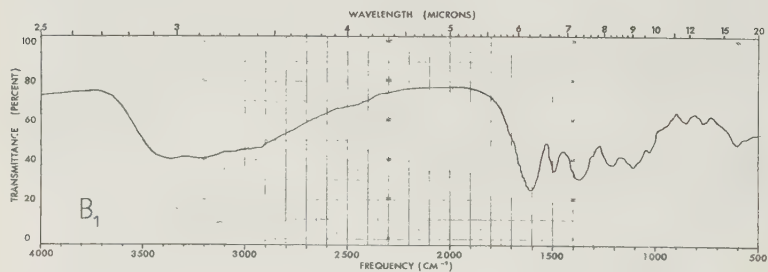


Abb. 24 IR-Spektrum von B_1 in KBr

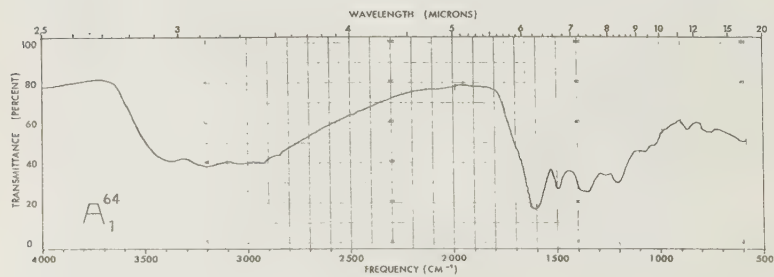


Abb. 25 IR-Spektrum von A_1^{64} in KBr

2. Schmelzpunkt

Die Farbstoffe besitzen keinen Schmelzpunkt. In ihrem thermischen Verhalten lassen sich drei Stadien unterscheiden:

1. Verschwinden der Farbe und gleichzeitiges Dunkelfärben.
2. Aufhellen.
3. Verkohlen $>300^{\circ}\text{C}$.

3. Löslichkeit

Die gereinigten Farbstoffe sind gut löslich in Wasser, geringfügig in Methanol und unlöslich in Äthanol und allen anderen unpolareren Lösungsmitteln.

4. Bestandteile

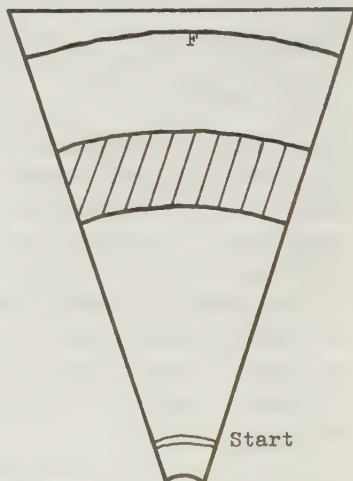
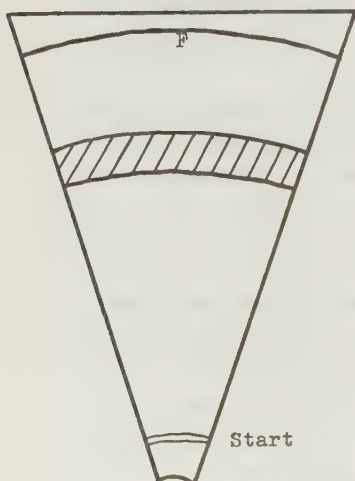
a) Röntgenfluoreszenz

Mit Hilfe der Röntgenfluoreszenz lassen sich in jedem Farbstoff Zink, Kupfer, ferner Eisen nachweisen. Zink in der Größenordnung von 1 %, Kupfer : 0,3 %. Vanadium enthält kein einziger Farbstoff. Dies ist insofern interessant, da der Fliegenpilz auffallend viel Vanadin¹⁵⁾ enthält. Das Vanadium kann auch nicht verlorengegangen sein; denn bei der Gewinnung des Rohproduktes 1965 geht das gesamte Vanadin in die methanolischen Auszüge, der wäßrige ist vollkommen frei von ihm.

b) Hydrolyse

Die Prüfung auf Aminosäuren (Ninhydrin) und Zucker (Anilinphthalat; Benzidin/Perjodat) mit Hilfe der Ringchromatographie fällt für alle Farbstoffe negativ aus. Lediglich bei B₂ lassen sich einige Aminosäuren nachweisen; er erscheint auch auf Grund seiner Extinktionswerte nicht als sauber. Hydrolysiert man jedoch A₁⁶⁴ mit 1n Salzsäure bei 100° 2 Stunden lang, so sind auf dem Chromatogramm mit Ninhydrin 2 Zonen nachweis-

bar, nach einer Hydrolysezeit von 24 Stunden in 5n Salzsäure bei 100° lassen sich die beiden und eine weitere nachweisen. Ferner ist jetzt auch der Nachweis mit Benzidin/Perjodat positiv, im kurzzeitig hydrolysierten Ansatz ist er nur ganz schwach. Mit Anilinphthalat erfolgt kein Nachweis. Die Zone (Abb. 26) besitzt einen R_F -Wert im Bereich der R_F -Werte von Lactose, Saccharose, Galactose, Lävulose, Sorbose, Arabinose, Xylose, Mannit und Sorbit, die unter diesen Bedingungen in einer breiten Zone (Abb. 27) zusammen wandern.



F = Fließmittelfront

Abb. 26 Papierchromatogramm des Hydrolysats von A_I^{64}

Abb. 27 Papierchromatogramm der Vergleichsmischung

Fließmittel: Collidin : Lutidin : Wasser = 1:1:1

Läßt man eine Lösung von A_1^{64} in konz. Schwefelsäure 3 Tage lang stehen, so zeigt sich ein furfurolähnliches UV-Spektrum (Abb. 28). Bandow²⁷⁾ fand dies als charakteristisch für Zucker und Zuckeralkohole.

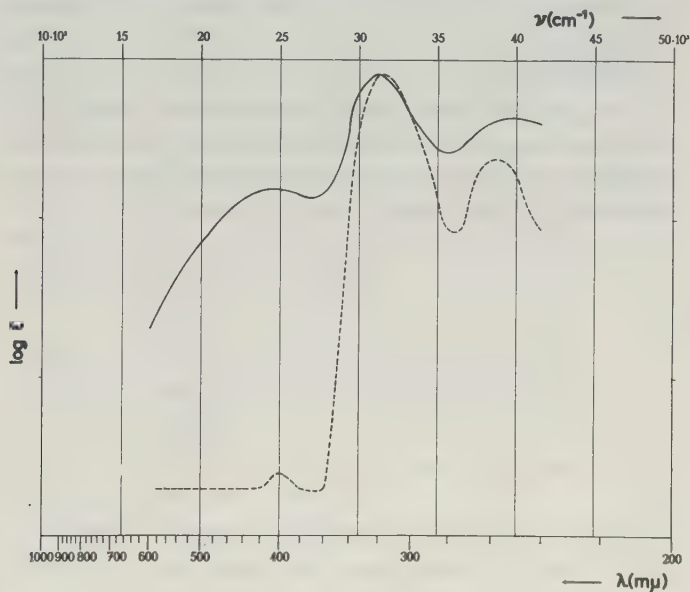


Abb. 28 UV-Spektrum von
 (----) Furfurol in konz. Schwefelsäure
 (—) A_1 in konz. Schwefelsäure nach 3 Tagen

5. Reaktionen

a) P_H -Wert

Die Farbstoffe sind nur im mittleren P_H -Bereich bis P_H 7 beständig. Auch bei größerem P_H -Wechsel zeigen sie keinen Farbumschlag.

b) Metallionen

Bei Zusatz von Zink-, Kupfer-, Eisen(II)-Ionen verändern sich bei allen Farbstoffen die Chromophore; z. T. entstehen neue, die mehr oder weniger beständig sind.

c) Komplexon

Bei Zugabe von festem Komplexon(III) zur Lösung eines Farbstoffs tritt keine Farbveränderung ein. Die Komplexkonstanten von Kupfer und Zink²⁹⁾ mit Komplexon sind 18,3 bzw. 16,1.

VII. Diskussion der Ergebnisse

Es ist verfrüht auf Grund der vorliegenden Ergebnisse, nähere Schlüsse auf die chemische Natur der Farbstoffe zu ziehen. Auffallend ist die Ähnlichkeit der Spektren der Farbstoffe, die für die IR-Spektren schon fast zur Gleichheit wird. Damit findet das während der Isolierung gezeigte gemeinsame Verhalten gegenüber den Verunreinigungen seine Erklärung.

Ohne eine genaue Kenntnis des Molekulargewichts der Farbstoffe läßt sich jedoch schlecht eine Aussage auf Grund der UV-Spektren machen. Legt man für die Farbstoffe ein Molekulargewicht von 5000 zu Grunde, so läßt sich über die Beziehung:

$$E = \epsilon \cdot c \cdot d$$

E = Extinktion, ϵ = Extinktionskoeffizient,
 c = Konzentration des Farbstoffes in $\text{Mol} \cdot \text{l}^{-1}$,
 d = Schichtdicke in cm

ein Extinktionskoeffizient der Farbstoffe abschätzen:
für A_1 z. B. $\epsilon_{A_1} = 130000$.

Vergleicht man mit diesem Wert das übrige UV-Spektrum, so liegen selbst schwächer ausgeprägte Banden wie bei ca. 250 μ für A_1 noch in der Größenordnung von $\epsilon = 40000$, also vergleichbar mit den K-Banden konjugierter Doppelbindungen. Bei den übrigen Farbstoffen liegen die Verhältnisse ähnlich.

Auch die IR-Spektren sind schwierig zu interpretieren, da sie keine aufgelösten Banden zeigen. Wegen der hohen Werte der spezifischen Extinktion sind sie aber doch als charakteristisch anzusehen. Eine Verunreinigung durch Sephadex ist unwahrscheinlich, da sich bei der Hydrolyse von A_1 keine Glucose nachweisen läßt; die Reaktion mit Anilinphthalat ist negativ. Ferner beträgt die Säulenelution nur 1 mg auf 100 ml Eluat, die Farbstofffraktionen liegen aber zum Schluß in der Größenordnung von einigen Millilitern.

Interessant ist die Anwesenheit von Metallen. Da alle

Farbstoffe den Ionenaustauscher passiert haben, können diese Metalle nicht ionisch gebunden sein.

Welcher Farbstoff ist Muscarufin?

Kögl¹⁾ gibt für Muscarufin folgende Eigenschaften an - es werden nur die aufgeführt, die bereits jetzt überprüfbar sind:

1. Schmelzpunkt bei 275,5°C;
2. Absorptionsmaximum bei 502 m μ ;
3. zeigt Farbumschlag bei P_H-Wechsel.

Keiner der isolierten Farbstoffe hat diese Eigenschaften. Ferner gilt für die UV-Spektren ganz allgemein, daß sie nicht mit der Struktur eines Benzochinons²⁸⁾ vereinbar sind. Dies besitzt intensive Banden ($\log \epsilon = 4$) zwischen 240 - 290 m μ und schwächere im Bereich um 400 m μ ($\log \epsilon = 2 - 3$). Selbst bei Unkenntnis des Molekulargewichts kann man sagen, daß entweder die Extinktion der Banden im Sichtbaren zu hoch oder die Extinktion der Banden im kürzerwelligen UV-Bereich zu niedrig ist.

Für die Hutfarbe des Fliegenpilzes sind die bisherigen Ergebnisse insofern von Bedeutung, da sie zeigen, daß die Farbe nicht von einem Farbstoff herrührt, sondern von einem Farbstoffgemisch.

Die Farbstoffe haben in Lösung folgende Farbe:

B ₀	($\lambda_{\max}$	553 m μ)	blauviolett
A ₀	($\lambda_{\max}$	478 m μ)	orange
B ₁	($\lambda_{\max}$	540 m μ)	karmoisin
A ₁	($\lambda_{\max}$	478 m μ)	orange
B ₂	($\lambda_{\max}$	515 m μ)	purpurrosa
	($\lambda_{\max}$	425 m μ)	gelb

In der Natur lassen sich deutlich zwei Gruppen von Fliegenpilzen unterscheiden: eine hellrote und eine dunkelrote Sorte. Ihr verschiedener Farbton läßt sich einfach mit einer unterschiedlichen Mischung der Farbstoffe erklären. Das Kuriose an der Farbe des Fliegenpilzes ist, daß die Haut viele Farbstoffe enthält, aber
keinen eigentlich roten !

VIII. Zusammenfassung der Ergebnisse

Mit Hilfe einer variierten Adsorptionschromatographie an Sephadex gelingt die Isolierung der einzelnen Farbstoffe des Fliegenpilzes. Die Trennung und Reinigung der Farbstoffe führen zu sauberen Maxima der Adsorptionsbanden mit hohen spezifischen Extinktionen.

Für die Richtigkeit der Kögl'schen Formel von Muscarufin fehlt jeder Hinweis, da

1. die UV-Spektren der Farbstoffe mit einem Benzochinon nicht vereinbar sind;
2. der Fliegenpilz in der Haut seines Hutes keinen roten Farbstoff enthält, sondern ein Farbstoffgemisch, das sich im wesentlichen zusammensetzt aus einem blau-violetten, einem karmoisinfarbenen, einem purpurrosafarbenen Farbstoff und zwei orangefarbenen Farbstoffen.

IX. Experimenteller Teil

1. Gewinnung des Rohproduktes

Für die Jahrgänge 1961 - 1964 war die Gewinnung des Rohprodukts folgende: Von den Hüten der frisch gesammelten Pilze wurde die Haut abgezogen und mit Methanol bedeckt. Der Ansatz blieb dann im Kühlschrank bei 0°C 4 - 5 Tage stehen. Nach dieser Zeit wurden die Häute abgepreßt. Da sie dann noch eine rotbraune Farbe zeigten, wurde weiter mit Methanol extrahiert, dem aber in den späteren Jahren (1963³⁾, 1964) mindestens 1/4 Volumen Wasser zugesetzt wurde.

Die reichlich verdünnten Lösungen wurden dann im Wasserstrahlvakuum bei $10 - 20^{\circ}\text{C}$ eingedickt, wobei im wesentlichen das Methanol abdestillierte. Die nahezu wäßrigen Lösungen wurden eingefroren und gefriergetrocknet. Die festen Rückstände wurden in einer Tiefkühltruhe bei -40°C aufbewahrt.

Auf Grund der Schwerlöslichkeit der Farbstoffe in Methanol wurde das Extraktionsverfahren 1965 abgeändert. Da in den Pilzhäuten viel Wasser enthalten ist, ist es wichtig bei der ersten Extraktion, einen großen Überschuß an Methanol zu nehmen. Die Methanolextraktion wurde einmal wiederholt. Da hierbei die Pilzzellen weitgehend zerstört werden, ist die anschließende Wasserextraktion in wenigen Minuten beendet. Extrahiert wurde bei Zimmertemperatur, die gesamte Extraktionsdauer betrug ca. 30 Min. Die methanolischen Extrakte wurden in der oben beschriebenen Weise konzentriert und zum Schluß gefriergetrocknet. Der wäßrige Extrakt wurde gleich gefriergetrocknet.

Zahlenmäßig sahen die Verhältnisse wie bei folgendem Beispiel aus:

605 g Pilze ergaben 50 g Haut, die zweimal mit 500 ml Methanol extrahiert wurden und anschließend mit 300 ml Wasser. Die gefriergetrockneten Rückstände waren:

1. 1,050 g
2. 0,303 g
3. 0,173 g

Die spezifische Extinktion für den gefriergetrockneten Wasserextrakt betrug: $\epsilon_{480}^s : 4,75$ $\epsilon_{540}^s : 0,92$.

Er hatte ein fast schwarzes Aussehen.

Die Aufbewahrung war die gleiche wie bei den anderen Rohprodukten.

2. Verunreinigungen

Bis auf Zink, Kupfer siehe³⁾. Zink und Kupfer wurden mit Hilfe der Röntgenfluoreszenz nachgewiesen.

Gemessen wurde mit einem Philips-Vakuum-Spektrograph PW 1540. Die Bedingungen waren:

Spannung:	50 KV	Wolfram-Röhre
Stromstärke:	20 mA	Litiumfluorid-Kristall

Als Detektor diente ein Scintillationszähler.

3. Verhalten der Farbstoffe³⁾

- a) Einfluß von Luft, Temperatur, Licht und P_H -Wert
- b) Elektrophorese
- α) P_H -Abhängigkeit
- β) Elphor VaP

Die genaue Beschreibung der Versuche und ihre Ergebnisse sind in der Diplomarbeit³⁾ enthalten.

4. Anionenaustauscher - Elektrophorese³⁾

Die genaue Beschreibung der Versuche und ihre Ergebnisse sind in der Diplomarbeit³⁾ enthalten.

5. Dialyse

Dialysiert wurde mit einem "Cellophan"-Dialysierschlauch der Firma Kalle AG: Durchmesser 3,4 cm bei Zimmertemperatur.

Einsatz: 0,5 g Rohextrakt in 1 ml Wasser.

Äußeres Volumen: 300 ml Wasser.

Dauer: 5 Stdn.

6. Sephadex

Bei allen Versuchssäulen waren die äußeren Maße gleich; sie betrugen: Länge: 25 cm, Durchmesser: 0,9 cm.

Die Proben des Rohproduktes wurden in 0,5 ml Wasser gelöst und vorsichtig auf die Säule gegeben. Anschließend wurde mit Wasser nachgewaschen. Die Fraktionen sind nach unterscheidbaren Zonen aufgefangen. Gearbeitet wurde bei Zimmertemperatur.

Die Ergebnisse von Sephadex G 25 enthält die Diplomarbeit³⁾. Für Sephadex G 50 und G 75 waren sie:

Einwaage [mg]	Sephadex G 50			Sephadex G 75		
	205			190		
Tr/ml	13			13		
Tr/min	2,3			3		
Dauer [min]	A 79		E 128	A 58		E 100
	Gew. [mg]	ξ^{S}_{480}	ξ^{S}_{540}	Gew. [mg]	ξ^{S}_{480}	ξ^{S}_{540}
Frakt. Vorl.	17,5	-	-	8	-	-
" 1	12	0,1	0,015	7,4	0,25	-
" 2	50,2	0,1	0,01	27,2	0,18	-
" 3	117,5	0,5	0,03	141	0,48	0,04
" 4	6	2,73	0,1	2	1,85	0,25
" 5	1	1,83	0,17	2,3	1,29	0,31
" Nachl.	1,3	-	-	0,9	-	-

Tr = Tropfen; A = Anfang; E = Ende

7. Adsorptionsvariationen

a) Adsorption und Polarität des Lösungsmittels

Die Versuchsbedingungen und Ergebnisse sind alle in der Diplomarbeit³⁾ enthalten.

b) Adsorption und Ionenausschluß

Ergebnisse für CM-Sephadex C 25 NH_4^+ - und Na^+ -Form siehe Diplomarbeit³⁾. Die Ergebnisse für

SE-Sephadex C 25 in der Na^+ -Form waren:

Einwaage [mg]	185	
Tr/ml	13	
Tr/min	1,5	
Dauer [min]	A 36	E 101
	Gew. [mg]	
Fraktion Vorl.	0,1	
" 1	1,6	
" 2	11,5	
" 3	20	
" 4	23,8	
" 5	18,1	
" Nachl.	90,3	

c) Adsorption und Azidität

Die Werte für CM-Sephadex C 25 in der H^+ -Form siehe Diplomarbeit³⁾. Für SE-Sephadex C 25 in der H^+ -Form waren die Ergebnisse:

Einwaage [mg]	185	
Tr/ml	13	
Tr/min	3	
Dauer [min]	A 45	E 100
	Gew. [mg]	
Fraktion Vorl.	8	
" 1	6,5	
" 2	51	
" 3	92	
" 4	25,5	
" Nachl.	9,5	

Es blieb viel Farbstoff hängen, eluiert wurde mit 0,5 mol KCl-Lösung.

8. Isolierung der Farbstoffe

a) Anreicherungsverfahren

Einsatz: 75 g gefriergetrockneter Rohextrakt des

Jahres 1964

spezifische Extinktion: ϵ_{480}^s : 1,03; ϵ_{540}^s : 0,154

1. CM-Sephadex C 25 in der NH_4^+ -Form

Zubereitung des CM-Sephadex siehe Diplomarbeit³⁾.

Säulenlänge: 50 cm; $\varnothing$: 5,3 cm

Einsatz: jeweils 15 g Rohextrakt in 15 ml Wasser. Chromatographiert wurde bei Zimmertemperatur unter weitgehendem Ausschluß von Licht. Es wurde die gesamte Farbstofffraktion aufgefangen und gefriergetrocknet.

Ausbeute: 22,4 g

Spezifische Extinktion: ϵ_{480}^s : 3,15; ϵ_{540}^s : 0,46

2. Dialyse

Dialysiert wurde fraktioniert in

1. reinem Methanol	12 Stdn
2. 90 %igem Methanol	24 Stdn
3. 65 %igem Methanol	24 Stdn
4. reinem Wasser	24 Stdn

Das äußere Volumen betrug immer 14 l.

Einsatz: jeweils ca. 7 g des angereicherten Produkts.

Dialysiert wurde mit einem "Cellophan"-Dialysierschlauch $\varnothing$: 15 cm der Firma Kalle AG bei +10°C. Die äußere Flüssigkeit wurde mit einer Umwälzpumpe bewegt. Die Methanolfractionen wurden im Wasserstrahlvakuum konzentriert und anschließend gefriergetrocknet:

	Rückstand [g]	ϵ_{480}^s	ϵ_{540}^s
1. Methanol	43 (Öl)	-	-
2. 90 % Methanol	5,0827	2,55	0,36
3. 65 % Methanol	4,5667	8,25	1,21

Die Wasserfraktion enthielt wenig Farbstoff, so daß nur ein aliquoter Teil in die Gefrieretrock-

nung eingesetzt wurde:

100 ml $\longrightarrow$ 21 mg Rückstand

Daraus berechnet sich ein Gesamtrückstand von ca. 300 mg.

Spezifische Extinktion: $\epsilon_{480}^S : 5$ $\epsilon_{540}^S : 0,93$

Der Rückstand im Schlauch wurde gefriergetrocknet.

Ausbeute: 0,852 g

Spezifische Extinktion: $\epsilon_{480}^S : 7$ $\epsilon_{540}^S : 1,5$

Die Extinktionswerte liegen viel zu hoch, da der Untergrund des UV-Spektrums sehr hoch lag.

Es war aber noch Farbstoff anwesend.

3. CM-Sephadex C 25 in NH_4^+ -Form

Eingesetzt wurde nur die beste Dialysefraktion:

4,566 g in 10 ml Wasser

Bedingungen wie unter 1., am Ende der Farbstoffzone wurde etwas geschnitten.

Ausbeute: I 2,690 g $\epsilon_{480}^S : 11,8$ $\epsilon_{540}^S : 1,8$
 II 1,042 g $\epsilon_{480}^S : 2,22$ $\epsilon_{540}^S : 0,18$

4. Sephadex G 50 + 30 % Methanol

Zubereitung des Sephadex siehe Diplomarbeit³⁾.

Säulenlänge: 50 cm, $\varnothing : 3,8$ cm

Einsatz: 2,690 g in 5 ml 30 %igem Methanol.

Chromatographiert wurde unter weitgehendem Ausschluß von Licht bei Zimmertemperatur. Das zonenlose Chromatogramm, das lediglich im vorderen Teil infolge Verdünnung etwas heller war, wurde in 4 Fraktionen geteilt:

	Gewicht [g]	ϵ_{480}^S	ϵ_{540}^S
Fraktion VL = 0,076		-	-
" 1 = 0,278		2,53	0,218
" 2 = 0,929		4,75	0,388
" 3 = 1,363		15	2,5
" 4 = 0,116		12,35	4,35

5. Sephadex G 50 + 30 % Methanol

Säulenlänge: 50 cm, $\varnothing$: 2,8 cm

Einsatz: 1,364 g in 3 ml 30 %igem Methanol

Bedingungen siehe 4.

Chromatogramm wurde wieder in 4 Zonen geteilt:

	Gewicht [g]	ϵ_{480}^S	ϵ_{540}^S
Fraktion: 1	0,053	10	1,29
" : 2	0,363	8,4	0,79
" : 3	0,659	17,35	3
" : 4	0,150	17,75	4,53

Gute Fraktionen ergaben:

4. Fraktion 4: 0,116 g und 5. Fraktion 3: 0,659 g

" : 4: 0,150 g

Ausbeute: 0,9254 g; λ_{480} : 20,5%, λ_{540} : 27,4 %
bezogen auf Rohprodukt.

b) Trennungsmethode

1. CM-Sephadex C 25 H^+ -Form

Zubereitung des Kationenaustauschers

Der Kationenaustauscher wird in der Na^+ -Form geliefert. Normalerweise überführt man einen Kationenaustauscher in die gewünschte Form, indem man ihn auf einer Säule mit der entsprechenden Kationenlösung durchspült. Bei CM-Sephadex C 25 ist dies aus folgenden Gründen für die H^+ -Form nicht gut möglich, da

1. bei ihr die Durchflußgeschwindigkeit gering ist. Dies bedeutet ein langsames Arbeiten;
2. Sephadex gegen längere Säureeinwirkung empfindlich ist.

Der Austauscher wurde daher unter Wasser in einem Becherglas durch Zugabe von konzentrierter Ameisensäure in die H^+ -Form überführt. Dabei wurde nach jedem starken Ansäuern der Austauscher auf einer Nutsche gewaschen, bis das Waschwasser neutral ablief. Das Ganze dreimal. Die ersten

beiden Trennungs- und Reinigungsschritte wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Säulenlänge: 15 cm; $\varnothing$: 3,8 cm

Die Säulen wurden auf einen Saugtopf gesetzt, an dem das volle Wasserstrahlvakuum angeschlossen war.

Die Werte in Klammern beziehen sich auf das angereicherte Gemisch vom Jahrgang 1964.

Einsatz: 500 mg (900 mg)

Spezifische Extinktion: $\epsilon_{480}^s : 4,75$ $\epsilon_{540}^s : 0,92$

Es wurde in 60 mg Ansätzen chromatographiert (eine Steigerung auf 120 mg ist möglich), gelöst in 5 ml Wasser bei Zimmertemperatur und weitgehendem Ausschluß von Licht. Diese letzten beiden Bedingungen gelten für alle weiteren Versuche, ebenso die Abtrennung des Lösungsmittels durch Gefriertrocknung und werden nicht weiter erwähnt.

1. Durchgang:

	Gewicht [mg]	ϵ_{480}^s	ϵ_{540}^s
B ₀	94	2,59	0,91
A ₀	40,5	4,71	0,66
B ₁	48,3	15,25	3,57
B ₂	42,5	9,75	2,36
A ₃	15,2		
A ₄	10,4		
A ₅	7		

2. Durchgang:

		$\epsilon_{485}^s : 3,1$	$\epsilon_{553}^s : 3,15$
B ₀	30		
A ₀	20	12,5 (17)	1,78 (18)
B ₁	5,3	24,0 (25,2)	15,5 (14,5)
A ₁	12,6	26,5 (25,7)	2,7 (3,5)
B ₂	18,5	13,0 (22,15)	10,0 (14,5)
A ₃	4,8		
A ₄	1		
A ₅	1		

Die weiteren Reinigungs- bzw. Trennstufen werden für die einzelnen Farbstoffe gesondert aufgeführt.

B₀

Sephadex G 25

Säulenlänge: 30 cm; Ø: 1,7 cm

Einsatz: 30 mg in 0,5 ml Wasser gelöst.

Chromatographiert wurde mit reinem Wasser.

Trocknen des Farbstoffs im Hochvakuum (HV) bei 60°C.

Ausbeute: 3,3 mg

Spezifische Extinktion: $\epsilon_{558}^s : 5$ $\epsilon_{336}^s : 3,75$

Bei der HV-Trocknung war der Farbstoff weitgehend zerstört worden.

A₀

Sephadex G 25

Säulenlänge: 20 cm; Ø: 3,8 cm

Einsatz: 20 mg in 5 ml Wasser gelöst

Chromatographiert wurde in reinem Wasser.

Trocknen im HV bei 60°C.

Ausbeute: 3,3 mg (11 mg)

Spezifische Extinktion: $\epsilon_{478}^s : 11,2$ (18,69)

$\epsilon_{458}^s : 10,6$ (17,5)

B₁

1. Sephadex G 25

Säulenlänge: 25 cm; Ø: 1,7 cm

Einsatz: 5,3 mg + (27 mg) in 0,5 ml Wasser gelöst.

Chromatographiert wurde in reinem Wasser

2. Sephadex G 25

Säulenlänge: 25 cm; Ø: 1,7 cm

Chromatographiert wurde mit Wasser + 30 % Methanol.

In 0,5 ml dieses Gemisches wurde das rohe Produkt aus der 1. Trennung gelöst.

Trocknen im HV bei 60°C.

Ausbeute: 4,5 mg

Spezifische Extinktion: $\epsilon_{540}^s : 18$ $\epsilon_{303}^s : 5,7$

A₁

Sephadex G 25

Säulenlänge: 20 cm; Ø: 3,8 cm

Einsatz: 12,6 mg in 3 ml Wasser gelöst.
Chromatographiert wurde mit reinem Wasser.
Trocknen im HV bei 60°C.

Ausbeute: 4,6 mg (21,3 mg)

Spezifische Extinktion: ϵ_{478}^S : 25,7 (26,7)
 ϵ_{458}^S : 24,7 (23,8)

B₂

1. Sephadex G 25

Säulenlänge: 20 cm; $\varnothing$: 2,3 cm

Einsatz: 18,5 mg gelöst in 3 ml Wasser.

Chromatographiert wurde mit reinem Wasser.

2. Sephadex G 25

Säulenlänge: 20 cm; $\varnothing$: 2,3 cm

Chromatographiert wurde in Wasser + 30 % Methanol.

In 3 ml dieses Gemisches wurde das rohe Produkt aus der 1. Trennung gelöst.

Trocknen im HV bei 60°C.

Ausbeute: 4,2 mg

Spezifische Extinktion: ϵ_{510}^S : 5,0 ϵ_{338}^S : 2,2

9. Spektren

a) UV-Spektren

Soweit die Farbstoffe nicht im HV getrocknet wurden, wurden die Extinktionen mit einem selbstschreibenden Zeiß-Spektrometer gemessen; die Einwaage erfolgte auf einer Torsionswaage. Bei den im HV getrockneten Substanzen wurden die Extinktionswerte mit einem handbetriebenen Zeiß-Spektrometer PM QII bestimmt, die Einwaage erfolgte auf einer Mettler-Präzisionswaage. Gelöst wurden die Farbstoffe in 10 ml Wasser.

b) IR-Spektren

Die Einwaage betrug durchschnittlich 0,7 mg auf 300 mg KBr. Gemessen sind die Spektren auf einem

Perkin-Elmer 421.

10. Hydrolyse

Die Hydrolyse in Salzsäure wurde mit 2 mg A_1^{64} vorgenommen in einem geschlossenen Bombenröhrchen. Nachweise mit Ninhydrin und Anilinphthalat siehe Verunreinigungen. Die Zusammensetzung des Benzidin-Perjodat Reagenzes war:

- I 0,1 proz. wäßrige Natriummetaperjodatlösung.
- II Lösung von 2,8 g Benzidin in 80 volumenprozentigem Äthanol + 70 ml Wasser, 30 ml Aceton, 1,5 ml 1n HCl.

Die Reaktion mit konz. Schwefelsäure wurde in einer 1 cm Küvette mit 3 ml Schwefelsäure durchgeführt, in der etwa 0,1 mg A_1^{64} gelöst wurden. Die Küvette blieb im Dunkeln bei Zimmertemperatur stehen.

11. Reaktionen

Der Einfluß von P_H -Wert, Metallionen und Komplexen wurde in einer 1 cm Küvette rein qualitativ im Strahlengang eines Zeiss-Spektrometers untersucht.

X. Literaturverzeichnis

1. F. Kögl, H. Erxleben, Liebigs Ann. Chem. 479,
11 (1930)
2. H. Musso, Privatmitteilung
3. W. Grob, Diplomarbeit, Universität Marburg 1964
4. O. Schmiedeberg, R. Koppe, Das Muscarin,
Leipzig (1869)
5. E. Harnack, Arch. exp. Path. u. Pharm. 4, 168 (1875)
6. W. Heinisch, J. Zellner, Mh. Chem. 25, 537 (1904)
7. J. Zellner, Mh. Chem. 27, 281 (1906)
8. J. Zellner, Mh. Chem. 32, 133 (1911)
9. A. Küng, Z. physiol. Ch. 91, 241 (1914)
10. W. Karrer, Konstitution u. Vorkommen der organischen Pflanzenstoffe, Birkhäuser Verlag, Basel 1958
11. Th. Wieland, W. Motzel, H. Merz, Liebigs Ann. Chem. 581, 10 (1953)
12. C. H. Eugster, Hel. 39, 1002 (1956)
13. Erwähnt in Literaturzitat 14
14. C. H. Eugster, G. F. R. Müller, R. Good
Tetrahedron Letters, 23, 1813 (1965)
15. D. Bertrand, Bulletin of the American Museum of
National History, Vol. 94, 406 (1950)
16. J. Porath, P. Flodin, Nature 183, 1657 (1959)
17. P. Flodin, Dissertation, Universität Uppsala
(Schweden) 1962
18. H. Determann, Angew. Chem. 76, 635 (1964)
19. J. Porath, Pure appl. Chem. 6, 233 (1963)
20. B. H. Zünen, W. H. Stockmeyer, J. chem. Physics
17, 1301 (1949)
21. Th. Wieland, P. Duesberg, H. Determann,
Biochem. Z. 337, 303 (1963)
22. J. Porath, E. B. Lindner, Nature 191, 69 (1961)
23. W. C. Baumann, J. Eichhorn, J. Amer. chem.
Soc. 69, 2830 (1947)

24. H. P. Gregor, J. Amer. chem. Soc. 73, 642 (1951)
25. R. Brdička, Grundlagen der Physikalischen Chemie,
VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, 1963
26. R. M. Wheaton, W. C. Baumann,
Ind. Engng. Chem. 45, 1, 228 (1953)
27. F. Bandow, Biochem. Z. 294, 124 (1937)
28. A. J. Scott, Interpretation of the Ultraviolet
Spectra of Natural Products, Pergamon
Press, Oxford 1964
29. G. Schwarzenbach, E. Freitag, Hel. chim.
Acta 34, 1503 (1931)

Den Herren Dr. G. Stork und Dr. K. Müller danke ich für
die Aufnahme der Röntgenfluoreszenzspektren.

Lebenslauf

Am 11. September 1937 wurde ich als Sohn des Werkmeisters Fritz Grob und seiner Ehefrau Hildegard, geb. Lawrenz, in Gelsenkirchen geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule in Steinsfurt/Sinsheim und Castrop-Rauxel ging ich ab Ostern 1948 zur Oberschule in Castrop-Rauxel. Hier bestand ich im März 1957 die Reifeprüfung.

Für das Sommersemester 1957 ließ ich mich als Student der Mathematik an der Universität Göttingen einschreiben, wo ich im Sommersemester 1958 mein eigentliches Studium der Chemie begann. Nach dem Vor-diplom am 11. Oktober 1961 setzte ich mein Studium ab Wintersemester 1961 in Marburg (Lahn) fort, wo ich am 18. Dezember 1962 die mündliche Diplomprüfung ablegte. Im Januar 1963 begann ich unter der Leitung von Herrn Professor Dr. H. Musso mit der Diplomarbeit über das Thema: "Über Muscarufin".

Die Versuche zur Isolierung dieses Fliegenpilzfarbstoffes führten im Rahmen der Doktorarbeit unter der Leitung von Herrn Professor Dr. H. Musso im Chemischen Institut der Philipps-Universität Marburg (Lahn) zur Isolierung einer Reihe von Farbstoffen, die in der vorliegenden Dissertation: "Die Isolierung der Farbstoffe des Fliegenpilzes" beschrieben ist.

